

H1
TESIS/
2877

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN
FACTORES ESENCIALES PARA EL METABOLISMO DEL ADN
MITOCONDRIAL EN *Drosophila melanogaster***

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID REGISTRO GENERAL
Entrada 01 Nº. 200600005712 11/04/06 12:30:25

Reg. F.M. 25.975

**Cristina Adán Rovira
Madrid, 2006**



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de SOBRESALIENTE LOML CAUDE

Madrid, 26-V-06

A stylized handwritten signature in blue ink, possibly reading 'Luis'.A handwritten signature in blue ink, possibly reading 'Alfredo'.A large, stylized handwritten signature in blue ink, possibly reading 'Juan'.A handwritten signature in blue ink, possibly reading 'Luis'.A handwritten signature in blue ink, possibly reading 'Luis'.

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN
FACTORES ESENCIALES PARA EL METABOLISMO DEL ADN
MITOCONDRIAL EN *Drosophila melanogaster***

Memoria que presenta la Licenciada en Bioquímica
Cristina Adán Rovira
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director:
Dr. Rafael Garesse Alarcón
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Codirector:
Dr. Miguel Ángel Fernández-Moreno
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. CSIC-UAM.

Rafael Garesse Alarcón, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular, y **Miguel Ángel Fernández Moreno**, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

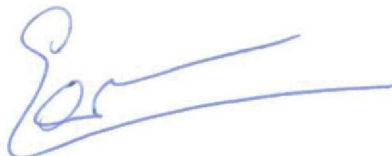
CERTIFICAN:

Que **Dña Cristina Adán Rovira**, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo nuestra codirección en el Departamento de Bioquímica / Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" UAM-CSIC, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, el trabajo titulado:

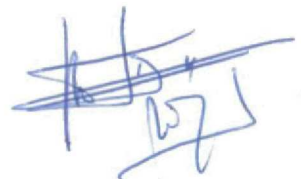
Caracterización funcional de genes que codifican factores esenciales para el metabolismo del ADN mitocondrial en *Drosophila melanogaster*

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral, con objeto de optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 7 de Abril de 2006



Rafael Garesse Alarcón
Departamento de Bioquímica UAM



Miguel Ángel Fernández Moreno
Departamento de Bioquímica UAM

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de
una Beca de Formación de Profesorado Universitario
por parte del Ministerio de Educación y Ciencia
a Cristina Adán Rovira.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Ahora, casi cinco años después de que cayeran en mis manos las primeras tesis que leí cuando llegué al laboratorio B19, logro entender la carga emotiva de los agradecimientos que en ellas se expresaban. Aunque tengo la sensación de que, en ocasiones como ésta, las palabras no consiguen expresar ni todo lo que uno siente ni todo lo que uno quiere decir, creedme que ésta es la parte que escribo con más ilusión.

Me vais a perdonar, pero me gustaría comenzar los agradecimientos en un orden distinto del establecido. Prefiero seguir un orden cronológico y, quizás, más lógico si nos referimos a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, querría agradecer a mis padres el haberme educado desde el respeto y la libertad ya que, de no haber sido así, esta tesis jamás se hubiera realizado. A mi padre darle las gracias por haberme enseñado a ser observadora y a intentar entender siempre el porqué de todas las cosas. A mi madre darle las gracias por haber sido ejemplo perfecto de organización y por inculcarme valores como el sentido de la responsabilidad en el trabajo, entre otros muchos. Y, por encima de todo, gracias a los dos por vuestro amor permanente y por vuestro apoyo constante.

En segundo lugar, querría agradecer a todos y cada uno de los profesores que he tenido tanto en el colegio como en la universidad el haberme proporcionado una formación humana e intelectual sólida que, sin duda, ha hecho más fácil la realización de este trabajo.

Por fin, agradecer al Dr. Garesse el haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y la del Dr. Fernández-Moreno. A Rafa darle las gracias por ser fuente constante de ideas y de estímulo para el trabajo, pero sobre todo por su enorme generosidad y comprensión en todos los sentidos. A Miguel darle las gracias por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio, por sus consejos y por sus ánimos en los momentos bajos. No podría haber encontrado mejores maestros.

Un especial agradecimiento a mis compañeros del B19. A Rosana por su ayuda inestimable, por su paciencia conmigo y por mantener siempre el ánimo arriba; creo que hicimos un buen tándem. A Emiliano por suponer constantemente un estímulo intelectual y personal; fue un placer trabajar en equipo contigo. A Pablo -y a Jimena- por su acogida cuando empecé y por su confianza estos años. Y a todos, Álvaro, Belén, Lucía, Maite, Paula, Paco y Pilar, por hacer del B19 un sitio agradable para trabajar y entrañable para convivir.

Gracias también a mis compañeros del B18 y del B20, por las risas y por las fiestas. Siempre fuisteis de enorme ayuda en cualquier cuestión relacionada con el mundo de la mosca. En especial, agradecer a Raquel y a Susana su amistad durante estos años. Ha sido genial poder compartir con vosotras los avatares experimentales y personales. Gracias por vuestro apoyo y por todo lo que he aprendido de vosotras.

Querría dar las gracias al resto de compañeros del Departamento de Bioquímica, del IIB, de los servicios generales y de los servicios de apoyo a la investigación (Almacén, Bioinformática, Confocal, Imagen científica, FACS, Radiactividad, Recepción y Secuenciación) porque, en algún momento y de alguna forma u otra, seguro que habéis participado en este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Laurie Kaguni y al Dr. Yuitshi Matsushima de la Universidad de East Lansing (Michigan, EE.UU) con quienes hemos mantenido una estrechísima colaboración todos estos años. Este trabajo forma parte de un proyecto conjunto que se inició cuando yo llegué al B19 y en el que he tenido la suerte de participar. Gracias por vuestro trabajo, vuestras sugerencias y vuestra ayuda.

Y no puedo dejar de agradecer la ayuda prestada por los laboratorios del Dr. Ginés Morata, del Dr. Alberto Ferrús y del Dr. Juan José Aragón. Especialmente gracias a Manolo, a Jesús y a Valentina por haberme enseñado algunas técnicas experimentales que han enriquecido sustancialmente este trabajo. Sin vuestra colaboración esto ni hubiera sido posible ni hubiera salido tan bonito.

Gracias a mis hermanos, Beita, Juan y Moni, por ser fuente continua de ilusión y de curiosidad.

Gracias a mis abuelos por su admiración y por sus comidas tan ricas.

Gracias a todos los que formáis “mi familia”, un tanto atípica sí, pero no imagino otra mejor. Especialmente gracias a Begoña y a Stéphane por cuidar de todos nosotros tan estupendamente.

Gracias a todas mis amigas, en especial a Anita, Angie, Bebi, Carito, Lu, Marta, Mery, Moni, Pati y Patri. Agradeceros vuestro apoyo y vuestro ánimo en los momentos duros, vuestro interés a pesar de no entender mucho y vuestra alegría en los momentos felices. Pero, sobre todo, gracias por tantos años compartidos.

Gracias a todos mis amigos, entre ellos a Carlos, Larry, Manu, Mori y Nico, por escucharme y hacerme reír durante todo este tiempo. Y, muy especialmente, gracias a Ramonet por su apoyo incondicional estos años y por todo lo demás.

Gracias a mis compañeros de la gimnasia de Paco por compartir muchas tardes de desconexión y por vuestro interés en mi trabajo, más concretamente, en mis moscas. En especial, gracias a Paco por su innegable tesón y su admirable fuerza de voluntad.

Y, cómo no, gracias a todos mis amigos y amigas navegantes y no navegantes por los viajes, las vacaciones y los fines de semana compartidos en el mar, en las montañas o en algún otro lugar. Los días de navegación en el Atrevit, las islas, Altea, los otros mares... No sólo disfruté cada minuto con todos vosotros sino que fueron momentos de descanso e inspiración para realizar este trabajo.

Por último, deciros que aunque esta tesis la firme solamente yo porque no puede ser de otra manera, siento que son muchos los que deberían acompañarme. Éste no es trabajo de una persona sola sino de un equipo en el que cada uno hemos colaborado en mayor o menor medida.

Y termino diciendo que, aunque haya habido algunos momentos difíciles -pero pocos- y a pesar de ellos, siento que ésta ha sido una etapa divertida y enormemente enriquecedora para mí, tanto a nivel intelectual como personal. A todos vosotros, gracias por ello.

RESUMEN/SUMMARY

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
--------------------	---

INTRODUCCIÓN

1. LA MITOCONDRIA	1
1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en la célula	1
1.2. Función mitocondrial	2
2. SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL	3
2.1. Características del genoma mitocondrial	3
2.2. Replicación del ADN mitocondrial	4
2.2.1. Mecanismos de replicación del ADN mitocondrial	5
2.2.2. Proteínas implicadas en la replicación del ADN mitocondrial	6
2.3. Transcripción del ADN mitocondrial	8
2.3.1. Proteínas implicadas en la transcripción del ADNmt	9
2.3.2. Mecanismo de inicio de la transcripción del ADNmt	11
2.4. Traducción del ADN mitocondrial	11
3. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL	12
3.1. Comunicación bidireccional núcleo-mitocondria	12
3.2. Factor de transcripción DREF	13
4. <i>Drosophila melanogaster</i>	14
4.1. Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
4.2. Función de las hormonas en el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
4.3. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo	15
5. INTERFERENCIA DE ARN (RNAi)	16

OBJETIVOS	19
-----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES	21
1.1. Reactivos, soluciones y tampones	21
1.2. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
1.3. Líneas celulares	21
1.4. Cepas de bacterias	21
1.5. Oligonucleótidos	21
1.5.1. Oligonucleótidos empleados en el estudio de las regiones promotoras	22
1.5.2. Oligonucleótidos empleados en la interferencia de ARN de los genes <i>d-mtTFB1</i> y <i>d-mtTFB2</i>	23
1.6. Vectores	23
1.7. Clones	24
1.7.1. Clones generados para el estudio de las regiones promotoras	24
1.7.1.1. Gen <i>d-mthelicasa</i>	24
1.7.1.2. Gen <i>d-mtTFB1</i>	25
1.7.1.3. Gen <i>d-mtTFB2</i>	25
1.7.1.4. Gen <i>DmTTF</i>	26
1.7.2. Clones generados para la interferencia de ARN de los genes <i>d-mtTFB1</i> y <i>d-mtTFB2</i>	26
1.8. Sondas	27
1.9. Radioisótopos	27
1.10. Anticuerpos	27
2. MÉTODOS	28
2.1. Clonajes	28
2.2. Obtención de ácidos nucleicos	28
2.2.1. Obtención de ARN de <i>D.melanogaster</i>	28

2.2.2. Obtención de ADN	28
2.2.2.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	28
2.2.2.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	28
2.2.2.3. Obtención de ADN genómico de <i>D.melanogaster</i>	28
2.3. Secuenciación y análisis de secuencias	29
2.4. Obtención de proteínas	29
2.4.1. Preparación de extractos nucleares de células Schneider S2 y embriones	29
2.4.2. Preparación de extractos de proteína total de larvas	29
2.4.3. Preparación de extractos de proteínas mitocondriales de larvas	30
2.4.3.1. Proteínas mitocondriales para inmunodetección	30
2.4.3.2. Proteínas mitocondriales para medir la actividad de la cadena respiratoria	30
2.4.3.3. Obtención de mitocondrias para medir la capacidad de síntesis de ATP	30
2.5. Determinación del sitio de inicio de transcripción	30
2.6. Cultivo de células Schneider S2	30
2.7. Ensayos de transfección transitoria en células en cultivo	31
2.8. Ensayos de retardo en gel	31
2.9. Ensayos de localización subcelular	31
2.10. Cultivo de <i>D.melanogaster</i>	31
2.11. Generación de líneas transgénicas de <i>D.melanogaster</i>	32
2.12. Experimentos UAS-GAL4	32
2.13. Análisis de los niveles de ARNm por qRT-PCR	32
2.14. Marcaje de sondas	32
2.15. Hibridación de ADN unidos a membrana (Southern blot)	33
2.16. Hibridación de ARN unidos a membrana (Northern blot)	33
2.17. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western blot)	33
2.18. Estudio de la viabilidad de líneas y cruces	33
2.19. Medida de masa y tamaño de larvas de <i>D.melanogaster</i>	33
2.20. Preparación y fotografía de mandíbulas y espiráculos de larvas de <i>D.melanogaster</i>	34
2.21. Estudio de la función mitocondrial	34
2.21.1. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria	34
2.21.2. Análisis de la capacidad mitocondrial de síntesis de ATP	34
2.22. Estudio de la ruta glucolítica	34
2.22.1. Medida de la actividad del enzima fosfofructoquinasa	34
2.22.2. Medida de la concentración de los metabolitos intermediarios de la glucólisis	35
2.23. Efectos del suministro oral de ecdisona	35
2.24. Detección de actividad β -galactosidasa en el sistema muscular larvario por tinción con X-Gal	35
2.25. Inmunocitoquímica	35
2.25.1. Visualización del sistema nervioso y de las uniones neuromusculares	35
2.25.2. Visualización del patrón de expresión del gen <i>wingless</i> y de células apoptóticas en discos imaginales de ala	36
2.25.3. Visualización de la proliferación celular en el sistema nervioso central por tinción con BrdU	36
2.26. Citometría de flujo	36
2.27. Análisis estadístico de los resultados	36

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE GENES ESENCIALES PARA LA REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL	37
1.1. Antecedentes sobre la identificación y el clonaje de los genes analizados	37
1.2. Localización subcelular	38
1.3. Determinación del sitio de inicio de transcripción	39
1.4. Caracterización de las regiones promotoras	40
1.4.1. Análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras	40
1.4.2. Análisis funcional de las regiones promotoras en células en cultivo	42
1.4.2.1. Región promotora del gen <i>d-mtTFB1</i>	42
1.4.2.2. Región promotora del gen <i>d-mtTFB2</i>	44
1.4.2.3. Región promotora del gen <i>d-mthelicasa</i>	45
1.4.2.4. Región promotora del gen <i>DmTTF</i>	46

1.4.3. Caracterización funcional del elemento DRE en los promotores analizados	48
2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES <i>d-mtTFB1</i> Y <i>d-mtTFB2</i> MEDIANTE INTERFERENCIA DE ARN EN <i>D.melanogaster</i>	51
2.1. Introducción	51
2.2. Estrategia experimental de RNAi	51
2.2.1. Generación de líneas transgénicas	51
2.2.2. "Drivers" GAL4	52
2.2.3. Inducción de la interferencia de ARN	52
2.3. Fenotipo de la interferencia de los factores mitocondriales tipo B en <i>D.melanogaster</i>	53
2.3.1. RNAi del gen <i>d-mtTFB1</i>	53
2.3.2. RNAi del gen <i>d-mtTFB2</i>	53
2.4. Caracterización del fenotipo de las larvas RNAi-B2	55
2.4.1. Evolución y viabilidad de los cruces RNAi-B2	55
2.4.2. Caracterización del estadio en que se detiene el desarrollo de las larvas RNAi-B2	56
2.4.3. Medida de la masa y del tamaño de las larvas RNAi-B2	57
2.4.4. Efectos del aporte exógeno de ecdisona en las larvas RNAi-B2	58
2.5. Caracterización molecular de las larvas RNAi-B2	59
2.5.1. Niveles de expresión de los genes <i>d-mtTFB2</i> y <i>d-mtTFB1</i> en las larvas RNAi-B2	59
2.5.2. Niveles de expresión de genes codificados en el genoma mitocondrial en las larvas RNAi-B2	61
2.5.3. Niveles de ADNmt en las larvas RNAi-B2	62
2.6. Caracterización bioquímica de las larvas RNAi-B2	63
2.6.1. Análisis de la actividad de los complejos OXPHOS en las larvas RNAi-B2	63
2.6.2. Análisis de la capacidad mitocondrial de síntesis de ATP en las larvas RNAi-B2	64
2.6.3. Análisis de la ruta glucolítica en las larvas RNAi-B2	65
2.6.3.1. Medida del flujo glucolítico	65
2.6.3.2. Medida de la actividad fosfofructoquinasa	66
2.6.3.3. Medida del balance energético	67
2.7. Caracterización del desarrollo tisular de las larvas RNAi-B2	68
2.7.1. Análisis del sistema muscular de las larvas RNAi-B2	68
2.7.2. Análisis del sistema nervioso de las larvas RNAi-B2	69
2.7.3. Análisis de los discos imaginales de las larvas RNAi-B2	69
2.7.3.1. Expresión del gen <i>wingless</i> en los discos imaginales de ala	70
2.7.3.2. Niveles de apoptosis en los discos imaginales de ala	70
2.8. Análisis de los niveles de proliferación y crecimiento celular en las larvas RNAi-B2	73
2.8.1. Análisis de la proliferación celular en el sistema nervioso central de las larvas RNAi-B2	73
2.8.2. Análisis del tamaño celular y del número de células en las larvas RNAi-B2	75
DISCUSIÓN	
1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DEL ADNmt EN <i>Drosophila melanogaster</i>	77
1.1. Análisis de los promotores basales	78
1.2. Análisis de las regiones promotoras	79
1.2.1. Factores de respiración nucleares NRF-1 y NRF-2	79
1.2.2. Elemento NRG	80
1.2.3. Sistema DRE/DREF	81
2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES <i>d-mtTFB1</i> Y <i>d-mtTFB2</i>	83
2.1. Estrategia experimental utilizada para generar fenotipos de pérdida de función	85
2.2. RNAi <i>in vivo</i> del gen <i>d-mtTFB1</i>	86
2.3. RNAi <i>in vivo</i> del gen <i>d-mtTFB2</i>	86
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

20-HE	20-hidroxicdisona
ACT 5C	actina 5C
ADN, DNA	ácido desoxirribonucleico
ADNc, cDNA	ADN copia
ADNg, gDNA	ADN genómico
ADNmt, mtDNA	ADN mitocondrial
ADNn, nDNA	ADN nuclear
ADP	adenosina difosfato
AED	after egg deposition, después de la puesta
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	AMP cíclico
ap	apterous
ARN, RNA	ácido ribonucleico
ARNm, mRNA	ARN mensajero
ARNr, rRNA	ARN ribosómico
ARNt, tRNA	ARN de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
BrdU	5'-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	bovine serum albumin, suero de albúmina bovina
cadena H	cadena pesada del ADNmt
cadena L	cadena ligera del ADNmt
CO, COX	Citocromo C oxidasa
Ct	extremo carboxilo terminal de una proteína
CyO	Curly of Oyster
da	daughterless
dATP	deoxiadenosina trifosfato
dCTP	deoxicitosina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dir	directo
dNTPs	deoxinucleótidos trifosfato
DRE	DNA replication related element
DREF	DRE binding factor, factor de unión a DRE
dsRNA	ARN de doble cadena
GAM	goat anti-mouse antibody, anticuerpo de cabra anti-ratón
GAR	goat anti-rabbit antibody, anticuerpo de cabra anti-conejo
GFP	green fluorescent protein, proteína verde fluorescente
HMG	High Mobility Group
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heavy strand promoter, promotor de la cadena pesada
Hsp60	heat shock protein 60
JH	hormona juvenil
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LSP	light strand promoter, promotor de la cadena ligera
luc	luciferasa
min	minutos
mtelic, mtH	helicasa mitocondrial
mtRPOL	mitochondrial RNA polymerase, ARN polimerasa mitocondrial
mtTFA, Tfam	factor de transcripción mitocondrial A
mtTFB1, B1, TFB1M	factor de transcripción B1 mitocondrial
mtTFB2, B2, TFB2M	factor de transcripción B2 mitocondrial
mtTTF, mTERF, DmTTF	factor de terminación de transcripción mitocondrial

mut	mutado
ND4, ND6	NADH deshidrogenasa subunidad 4, subunidad 6
NRF	Nuclear Respiratory Factors, factores nucleares de respiración
Nt	extremo amino terminal de una proteína
O _H	origen de replicación de la cadena pesada
O _L	origen de replicación de la cadena ligera
ORF	open reading frame, pauta de lectura abierta
OXPPOS	sistema de fosforilación oxidativa
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PFK	enzima fosfofructoquinasa
prox	proximal
PTTH	hormona protoracicotrópica
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa
RACE	rapid amplification of cDNA ends
rev	reverso
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference, interferencia de ARN
RP49	proteína ribosomal 49
SDH	actividad succinato deshidrogenasa
seg	segundos
siRNAs	small interfering RNAs, ARN interferentes pequeños
Tb	tubby
TBE	tampón tris borato EDTA
UAS	upstream activating sequence
UTR	untranslated region, región no traducida
UV	ultravioleta
V _{máx}	velocidad máxima
w	white
wg	wingless
X-gal	5'-bromo-4'-cloro-3'-indolil- β -D-galactopiranosido
yw	yellow white

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo presente en la práctica totalidad de las células eucariotas. La primera evidencia de su existencia data de la segunda mitad del siglo XIX, cuando se observaron por primera vez estructuras filamentosas en el citoplasma de muchos tipos celulares. El nombre de mitocondria se acuñó en 1898 a partir de los términos griegos *mitos* y *chondros*, que significan filamento y grano respectivamente. A mediados del siglo XX, gracias al desarrollo de la microscopía electrónica y de las técnicas de centrifugación diferencial, se produjeron grandes avances en el conocimiento de la estructura y la función de este orgánulo. Durante esta época se describieron varias rutas metabólicas -como el ciclo de Krebs o la fosforilación oxidativa- que ocurrían dentro de la mitocondria y que resultaron ser esenciales para la célula. En 1965 se observó que las mitocondrias contenían ADN en su interior (Schneider and Kuff 1965). A partir de esta observación surgieron varios planteamientos acerca del origen evolutivo de la mitocondria y hasta la década de los 80 no se aceptó como válida la hipótesis del origen endosimbiótico. Desde que en 1970 se iniciara la secuenciación de la primera molécula de ADN mitocondrial (ADNmt), progresivamente se ha ido obteniendo la secuencia de esta molécula en numerosas especies. En 1981 se completó la secuencia del ADNmt humano con un tamaño de 16569 pb (Anderson et al. 1981). El ADNmt de *Drosophila melanogaster* se secuenció entre 1983 y 1988 (de Bruijn 1983; Garesse 1988) y la secuencia definitiva, que consta de 19517 pb, se obtuvo en 1995 (Lewis et al. 1995).

El origen endosimbiótico de la mitocondria se postuló por primera vez a principios del siglo XX, pero no fue hasta la década de los 70 cuando F.Taylor y L.Margulis establecieron la Teoría Endosimbiótica (Margulis 1975). Según esta teoría, las mitocondrias presentes en las células eucariotas -y también los cloroplastos- se originaron al establecerse una relación de endosimbiosis entre una célula protoeucariota y una α -proteobacteria que vivía de forma independiente y, por tanto, contenía su propio genoma. Todos los estudios apuntan a que el evento de endosimbiosis ocurrió sólo una vez a lo largo de la evolución de la vida en la Tierra. Por tanto, se admite un origen único y común del conjunto de mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas (Scheffler 2001).

Aunque las mitocondrias han retenido sus funciones bioquímicas a lo largo de la evolución, debido a un proceso de transferencia génica contienen un genoma mucho menor que el de sus respectivos antecesores. Muchos de los genes del endosimbionte procariota necesarios para la función mitocondrial se translocaron al núcleo de la célula eucariota, de forma que la mayoría de los componentes del proteoma mitocondrial deben ser importados a la mitocondria (Timmis et al. 2004). Por este motivo, la mitocondria es un orgánulo semiautónomo ya que su genoma tiene una capacidad codificante limitada y necesita la contribución del genoma nuclear para su arquitectura, mantenimiento y funcionalidad (Kelly and Scarpulla 2004).

1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en la célula

La morfología, el número y la distribución son aspectos de la mitocondria que presentan una enorme plasticidad en función del tipo celular.

La mitocondria consta de una doble membrana que delimita dos compartimentos acuosos en su interior: el espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa, que separa el espacio

intermembranoso del citoplasma, es fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones y presenta transportadores hidrofílicos denominados TOM (translocase outer mitochondrial membrane) así como numerosos canales formados por la proteína porina (Bauer 2002). La membrana mitocondrial interna, a diferencia del resto de membranas celulares cuya composición de lípidos y proteínas se encuentra en una relación 1:1, presenta un contenido proteico del 75%. En ella se encuentra insertada la cadena de transporte electrónico y, por tanto, es responsable del proceso de fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP mitocondrial. Se trata de una membrana mucho menos permeable que la membrana mitocondrial externa pero alberga decenas de transportadores específicos (Arco and Satrústegui 2005), entre los que se encuentran TIM (translocase inner mitochondrial membrane) y OXA (Bauer 2002). El espacio que delimita la membrana interna constituye la matriz mitocondrial y es el lugar en el que transcurren las rutas metabólicas que se localizan en la mitocondria. La membrana mitocondrial interna presenta invaginaciones lamelares, denominadas crestas, que incrementan en gran medida la superficie de la misma y aumentan su capacidad funcional (Scheffler 1999). La densidad de las crestas es variable y depende de la demanda energética de la célula.

A pesar de que la estructura interna de las mitocondrias está bastante conservada, su forma externa es muy variable. Las mitocondrias pueden mostrar forma esférica o aspecto alargado. No tienen un tamaño fijo aunque normalmente sus dimensiones están en torno a 3-4 μm de largo y 1 μm de diámetro. La posición de las mitocondrias en la célula no es estática y su distribución no es al azar. Frecuentemente forman una red reticular que se establece por interacciones de unas mitocondrias con otras y, a su vez, de éstas con el citoesqueleto y con el sistema retículo endoplásmico (Nisoli et al. 2004).

En las células, el número de mitocondrias depende principalmente de su demanda energética. Oscila entre 10^2 - 10^5 y es constante para cada tipo celular (Scheffler 1999). Las mitocondrias se fusionan y se dividen constantemente, lo cual refleja también su naturaleza dinámica. En consecuencia, alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial afectan dramáticamente a la morfología de este orgánulo (Chen and Chan 2005). La proliferación mitocondrial está ligada normalmente a la proliferación celular y, por tanto, está regulada por factores de crecimiento, hormona tiroidea, estrés celular y niveles de O_2 . Desde la fase S y hasta la fase M del ciclo celular, las mitocondrias crecen y se dividen para dotar a las células hijas con la cantidad adecuada de masa mitocondrial. La división de las mitocondrias se produce por la fisión de las mismas. No obstante, existen situaciones en que la fisión mitocondrial no está estrictamente asociada al ciclo celular, como ocurre en algunos procesos apoptóticos. La fusión mitocondrial se desencadena cuando dos mitocondrias entran en contacto. A medida que se incrementa la motilidad de las mitocondrias, aumenta la probabilidad de choques entre ellas, y los eventos de fusión se ven favorecidos. La función de este proceso podría estar relacionada con la protección de las células frente a fenómenos apoptóticos (Meeusen and Nunnari 2005).

1.2. Función mitocondrial

La mitocondria es el principal productor de energía celular en forma de ATP. En ella tiene lugar el proceso de fosforilación oxidativa mediante el cual los coenzimas reducidos NADH y FADH_2 , procedentes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena respiratoria y finalmente al O_2 . La transferencia de electrones de unos transportadores a otros, que se realiza de forma secuencial a favor de potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de H^+ desde la matriz mitocondrial al espacio

intermembranoso. El gradiente electroquímico que se establece se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna. La energía generada por la disipación del gradiente de H^+ a través de la ATP-sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP. Esta reacción es reversible y la ATP-sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler 1999).

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) consta de cinco complejos enzimáticos (I-V) formados por aproximadamente 100 subunidades. Los complejos I-IV forman la cadena de transporte electrónico y el complejo V es la ATP-sintasa. Todos ellos contienen subunidades codificadas en el núcleo y en la mitocondria, a excepción del complejo II que está codificado exclusivamente por el genoma nuclear y que es el único no implicado directamente en la generación del gradiente de H^+ (Heales 2002).

Además de la producción de energía, en la mitocondria tienen lugar numerosas rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, la síntesis de purinas, del grupo hemo o de complejos ferrosulfurados. Además, la mitocondria participa en procesos celulares esenciales como la homeostasis del Ca^{+2} y la apoptosis.

Las alteraciones en el funcionamiento de la mitocondria, y en particular los defectos en la síntesis de ATP, provocan situaciones patológicas que suelen afectar principalmente a los tejidos con una mayor demanda energética como son músculo y tejido nervioso (Schapira 1999). Por este motivo, las enfermedades producidas por una disfunción mitocondrial generalmente cursan como encefalomiopatías o síndromes neurodegenerativos. El estudio y el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales resulta complejo puesto que éstas pueden ser ocasionadas por mutaciones en genes localizados tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial, su manifestación clínica es muy variable y no existe una clara relación entre el fenotipo y el genotipo.

2. SISTEMA GENÉTICO MITOCONDRIAL

2.1. Características del genoma mitocondrial

Cada mitocondria contiene su propio genoma en un número de copias que oscila entre 1 y 10. El ADNmt está localizado en la matriz mitocondrial y forma parte de unos complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados nucleoides (Bogenhagen et al. 2003).

En metazoos, el genoma mitocondrial es una pequeña molécula circular de doble cadena de ADN, cuyo tamaño varía entre 16 y 20 kb. Su capacidad codificante es muy limitada puesto que, normalmente, codifica exclusivamente 37 genes: 13 polipéptidos que forman parte de complejos OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S Y 16S) y 22 ARNs de transferencia (ARNt). A pesar de la extrema conservación de la capacidad codificante del genoma mitocondrial a lo largo de la evolución, existen variaciones entre vertebrados e invertebrados en cuanto a la disposición y distribución de los genes entre ambas cadenas. Una de las características del genoma mitocondrial que mejor refleja su origen evolutivo es la extraordinaria compactación génica que presenta. Los genes codificados en el genoma mitocondrial carecen de intrones, secuencias intergénicas y regiones no traducidas (UTRs) y pueden ser solapantes. En mamíferos, la composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina y citosina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina cadena ligera (L). En virtud de su distinta composición, ambas cadenas presentan densidades de flotación diferentes en gradientes

alcalinos de CsCl y pueden separarse por centrifugación.

Una de las propiedades más relevantes del genoma mitocondrial es que presenta un código genético propio, diferente del “universal”, que varía ligeramente en los diferentes *phyla*. Por otro lado, la genética mitocondrial presenta una serie de características que la diferencian claramente de la nuclear, entre las que se encuentran la herencia materna y la segregación mitótica (Hutchison et al. 1974; Macmillan et al. 1993).

Todos los genomas mitocondriales presentan una región no codificante de tamaño variable, pero en general pequeña. En ella se localizan el origen de replicación (O_H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP). Aunque su secuencia no está muy conservada entre los distintos géneros, contiene segmentos pequeños que sí están conservados y que son funcionalmente relevantes. En células metabólicamente activas, la región de control adopta una estructura de triple hélice, denominada D-loop o bucle de desplazamiento, en la que una pequeña molécula de ADN complementaria a la cadena L desplaza a la cadena H. La estructura de D-loop se genera durante la replicación del ADNmt por una parada en la síntesis de la cadena H naciente que tiene lugar dentro de la región de control. Aunque la secuencia del genoma mitocondrial de *Drosophila* se conoce desde hace tiempo, aún no se han localizado con precisión los orígenes de replicación ni sus regiones promotoras (Figura 1).

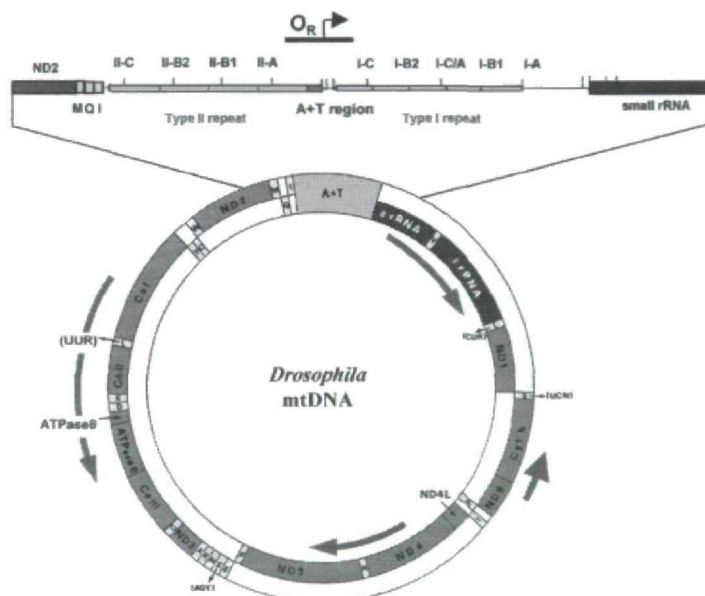


Figura 1. La organización del genoma mitocondrial de *D.melanogaster* (Garesse and Kaguni 2005).

En *Drosophila*, la región de control presenta un contenido en residuos de adenina y timina del 90-96% por lo que también se denomina región A+T. Su tamaño varía entre 1-5 kb según la especie. La secuencia de esta región refleja la conservación de un segmento rico en T y de dos elementos, I y II, entre las distintas especies. La implicación de estas secuencias en la replicación y transcripción del ADNmt es probable aunque todavía no se ha obtenido ninguna evidencia experimental (Garesse and Kaguni 2005).

2.2. Replicación del ADN mitocondrial

El mecanismo de replicación del ADNmt en mamíferos se caracterizó por primera vez hace más de 20 años (Clayton 1982). Los datos experimentales procedían de la observación directa por microscopía electrónica de moléculas de ADNmt purificadas a partir de cultivos celulares. En este sistema, la proliferación mitocondrial está estrictamente asociada a la proliferación celular y en cada ciclo celular el número de mitocondrias debe

uplicarse. Por este motivo resultó relativamente sencillo encontrar moléculas de ADNmt en proceso de replicación a las que se denominó intermedios de replicación (Taanman 1999). La situación en el animal es más complicada que en un sistema celular. Se sabe que el número de mitocondrias presentes en una célula es constante para cada tipo celular. Sería lógico pensar que, al menos en un tiempo próximo a la división celular, la replicación del ADNmt estuviera coordinada con la replicación del ADN nuclear (ADNn) para mantener constante el número de moléculas de ADNmt por mitocondria y, también, el número de mitocondrias por célula. Sin embargo, la replicación del ADNmt es menos estricta que la del ADNn en el sentido que, a lo largo del ciclo celular, el contenido del ADN en el núcleo se duplica una vez y específicamente durante la fase S, mientras que esto no sucede exactamente así con el ADNmt. Durante la embriogénesis y la diferenciación celular, el ADNmt se replica más de una vez durante el ciclo celular puesto que el número de mitocondrias por célula aumenta para satisfacer una mayor demanda energética. En tejidos adultos como músculo y cerebro, las mitocondrias se recambian lo que implica que la replicación del ADNmt se produce independientemente de la replicación del ADNn y de la división celular. En ocasiones, algunas moléculas de ADNmt no se replican durante el ciclo celular, sino que sólo lo hace una fracción de la población total como sucede durante la oogénesis (Poulton and Marchington 2002).

2.2.1. Mecanismos de replicación del ADN mitocondrial

▪ Modelo de replicación asimétrico y asincrónico

Este modelo de replicación ha prevalecido durante más de dos décadas desde que fuera descrito por el laboratorio de D. Clayton e implica la síntesis unidireccional, asimétrica y continua de las cadenas hijas de la nueva molécula de ADNmt a partir de sus respectivos orígenes de replicación en las cadenas parentales que sirven de molde (Clayton 2000). El origen de replicación de la cadena pesada se denomina O_H y el de la cadena ligera O_L . Según este modelo, los orígenes de replicación son específicos para cada cadena, se encuentran separados físicamente y la replicación se inicia en ellos en dos tiempos diferentes (Taanman 1999).

El mecanismo de replicación que propone este modelo requiere la participación de un número reducido de proteínas (Garesse and Kaguni 2005). La replicación del ADNmt se iniciaría con la síntesis de una nueva cadena H a partir de O_H , localizado en la región de control detrás del promotor de la cadena ligera (LSP), y procedería a lo largo de la molécula de ADNmt provocando el desplazamiento de la cadena H parental. La síntesis de la cadena L comenzaría cuando O_L , localizado en la cadena H a dos tercios de la longitud de la molécula de ADNmt respecto de O_H , quedara como ADN de cadena sencilla (Figura 2). Por tanto, la cadena H hija se completaría primero y la cadena L hija terminaría de sintetizarse más tarde. Como consecuencia de la replicación asimétrica de ambas cadenas, la molécula hija de ADNmt que contiene la cadena L sintetizada *de novo* se obtiene después que la otra y segrega antes de completar su replicación (Brown et al. 2005). Las características establecidas en un primer momento para este modelo de replicación han sido corroboradas por varios laboratorios, partiendo de distintas fuentes de ADNmt y utilizando estrategias experimentales diferentes (Clayton 2003).

▪ Modelo de replicación simétrico y acoplado

Este modelo de replicación alternativo fue propuesto en el año 2000 por I. Holt y H. Jacobs (Holt et al. 2000). A diferencia del anterior, en este modelo la replicación del ADNmt ocurriría de manera simétrica y simultánea en ambas cadenas (Figura 2). La síntesis de las cadenas hijas progresaría bidireccionalmente a

partir de varias horquillas de replicación, lo que haría necesaria la existencia de proteínas que catalizaran la formación de fragmentos de Okazaki (Garesse and Kaguni 2005).

Para establecer este modelo, Holt y sus colaboradores se basaron en la estrategia experimental de electroforesis bidimensional en geles de agarosa descrita por Brewer y Fangman, según la cual fragmentos de ADN digeridos por enzimas de restricción son separados por una primera electroforesis en condiciones nativas -sin bromuro de etidio- y, a continuación, resueltos en una segunda dimensión en presencia de bromuro de etidio. De este modo, fragmentos de restricción de ADNmt que contienen orígenes y horquillas de replicación son separados en una primera dimensión en función de su tamaño y en una segunda dimensión en función de su configuración. A partir de los datos experimentales así obtenidos Holt y Jacobs han propuesto que este mecanismo es la forma predominante de replicación del ADNmt (Yang et al. 2002).

La controversia que surgió en torno al mecanismo de replicación del ADNmt al establecerse este nuevo modelo sigue vigente en la actualidad. A pesar de que un análisis reciente de los intermedios de replicación realizado tanto por electroforesis bidimensional como por microscopía de fuerza atómica (AFM) sugiere que el modelo de replicación simétrico y acoplado pudiera ser incorrecto (Brown et al. 2005), ninguna evidencia experimental ha conseguido hasta la fecha establecer definitivamente y de forma concluyente cuál es el mecanismo de replicación del ADNmt.

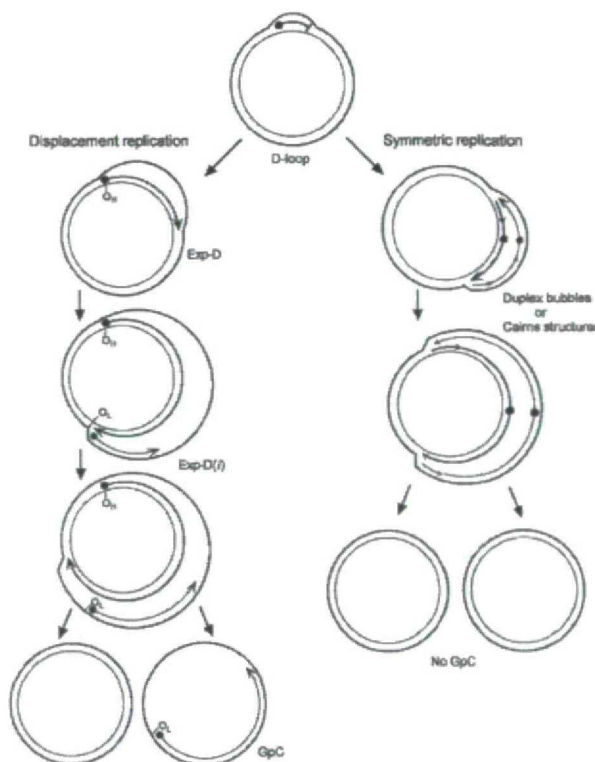


Figura 2. Modelos de replicación del ADN mitocondrial (Brown et al. 2005).

2.2.2. Proteínas implicadas en la replicación del ADN mitocondrial

Según el modelo de replicación asimétrico, el proceso de replicación del ADNmt está íntimamente relacionado con la transcripción del ADNmt puesto que el inicio de la replicación a partir de O_H requiere un cebador de ARN que se sintetiza a partir del promotor de la cadena ligera (LSP). En función de las proteínas presentes en la región de control, la transcripción que se inicia en el LSP puede generar transcritos policistronicos largos o transcritos muy cortos que terminan en O_H y aportan los extremos 3' necesarios para

el inicio de la replicación del ADNmt. Por tanto, la transición ARN-ADN ocurre dentro de la región de control y el procesamiento endonucleolítico de la molécula híbrida ARN-ADN lo realiza probablemente una endonucleasa denominada ARNasa-MRP (mtRNA processing endonuclease). La síntesis de ADN a partir de O_L requiere una ADN-primasa que reconoce la estructura de bucle que adopta la región O_L y, cuando ésta queda expuesta como ADN de cadena sencilla, sintetiza una pequeña molécula de ARN complementaria a un segmento rico en residuos de timina que precede al O_L .

Además de las proteínas implicadas en la síntesis de los cebadores de ARN, la replicación del ADNmt requiere la acción de la ADN-polimerasa mitocondrial (poly) y de la proteína mitocondrial de unión a ADN de cadena sencilla (mtSSB) así como la actividad topoisomerasa y helicasa de proteínas mitocondriales presentes en la horquilla de replicación que todavía no han sido totalmente caracterizadas. Según un trabajo recientemente publicado en el que se reconstituye *in vitro* el replisoma mínimo necesario para la replicación del ADNmt en mamíferos (Korhonen et al. 2004), la poly junto con la helicasa mitocondrial Twinkle es capaz de sintetizar ADN de cadena sencilla a partir de ADN de doble cadena. En presencia de la proteína mtSSB la procesividad del conjunto se incrementa hasta alcanzar los niveles observados *in vivo*. Por tanto, la unidad replicativa mínima consta de tres proteínas esenciales: poly, mtSSB y una helicasa mitocondrial.

▪ poly

Es la única ADN-polimerasa presente en mitocondrias animales. Este enzima es responsable de la replicación, la reparación y la recombinación del ADNmt. La poly es un miembro de la familia A de ADN-polimerasas entre las que se encuentran la ADN-polimerasa I de *E. coli* y la del bacteriófago T7 (Kaguni 2004).

La mayoría de las poly animales, entre ellas la de *Drosophila*, son heterodímeros que constan de dos subunidades: una subunidad catalítica (poly-A o subunidad α) y una subunidad accesoria (poly-B o subunidad β). La subunidad catalítica tiene un tamaño de 120-140 kDa y contiene actividad polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 3'→5', también denominada correctora de errores. La subunidad accesoria tiene un tamaño de 35-50 kDa y su función está relacionada con la integridad estructural y la procesividad del enzima. Por su secuencia primaria y su estructura, esta subunidad está relacionada con las aminoacil-ARNt sintetasas de tipo II presentes en procariotas y se ha sugerido que podría participar en el reconocimiento del cebador de ARN necesario para el inicio de la replicación del ADNmt. En *Drosophila*, los genes que codifican ambas subunidades se encuentran codificados en un "cluster" cuya densidad génica es superior a la media del resto del genoma. El complejo heterodimérico que constituye el holoenzima da lugar a una polimerasa eficiente y procesiva con alta fidelidad en la selección e incorporación de nucleótidos (Kaguni 2004). En levaduras, la poly está formada únicamente por la subunidad α y, recientemente, se ha demostrado que en ratones y en humanos este enzima es un heterotrímero formado por una subunidad α y dos subunidades β que dimerizan entre sí (Yakubovskaya et al. 2005).

Mutaciones en la subunidad α de la poly en humanos están asociadas con diversas patologías mitocondriales y la supresión de la actividad correctora de errores de este enzima en ratón provoca la acumulación de mutaciones en el ADNmt que conducen a un envejecimiento prematuro (Trifunovic et al. 2004). En *Drosophila*, los mutantes en los genes que codifican la subunidad catalítica (Iyengar et al. 1999) y la subunidad accesoria (Iyengar et al. 2002) presentan una depleción de ADNmt que provoca en letalidad durante la etapa larvaria.

▪ mtSSB

Es una proteína mitocondrial de unión a ADN de cadena sencilla cuya estructura es similar a la proteína SSB de *E.coli*. Su tamaño oscila entre 13 y 18 kDa. Su presencia en la horquilla de replicación, además de proteger el ADNmt de cadena sencilla, estimula la actividad de polímero que favorece el reconocimiento del cebador de ARN y facilita la unión de la polímero al origen de replicación (Farr et al. 1999). La cantidad de proteína mtSSB correlaciona con la abundancia del ADNmt y su expresión está regulada durante el desarrollo y en respuesta a señales fisiológicas (Ruiz de Mena et al. 2000).

En *Drosophila*, la proteína mtSSB es un tetrámero formado por subunidades de 16 kDa de tamaño. Los mutantes en este gen presentan una capacidad de respiración mitocondrial reducida, que produce defectos en la proliferación celular y que es la responsable de la letalidad observada durante el periodo larvario (Maier et al. 2001).

▪ helicasa mitocondrial

La actividad helicasa produce la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen apareadas las dos cadenas de la molécula de ADNmt. La presencia de esta actividad en la mitocondria se observó por primera vez en levaduras (Lahaye et al. 1993; Sedman et al. 2000). En humanos, se ha clonado el gen que codifica una helicasa mitocondrial que ha sido denominada Twinkle (Spelbrink et al. 2001). La proteína Twinkle presenta homología de secuencia en su región carboxilo terminal (Ct) con una helicasa/primasa del bacteriófago T7 y se encuentra localizada en los nucleoides. Muy recientemente se ha identificado en humanos una nueva proteína codificada por el gen h-SUV3 que tiene actividad helicasa y que se localiza también en la mitocondria (Minczuk et al. 2005). Sin embargo, su función todavía no ha sido establecida y se desconoce si tiene alguna implicación en la replicación del ADNmt. En *Drosophila* se ha identificado una única helicasa mitocondrial similar a Twinkle.

2.3. Transcripción del ADN mitocondrial

La caracterización del mecanismo de transcripción del ADNmt así como el estudio de las proteínas que intervienen en este proceso se ha realizado fundamentalmente en mamíferos.

A diferencia del genoma nuclear que se transcribe fundamentalmente por tres ARN-polimerasas multiméricas, el ADNmt se transcribe por una única ARN-polimerasa monomérica. Los promotores necesarios para la transcripción mitocondrial están localizados en la región de control del ADNmt y se denominan LSP, el de la cadena ligera, y HSP el de la cadena pesada. Ambos promotores se encuentran separados físicamente unos 150 pb, son divergentes y funcionan de forma independiente (Taanman 1999). La transcripción del genoma mitocondrial a partir de estos promotores genera transcritos policistrónicos que contienen toda la información genética presente en cada una de las cadenas de la molécula de ADNmt. En la cadena H existe un segundo sitio de inicio de la transcripción responsable de la síntesis de un pre-ARN que comprende la región de los genes que codifican los ARNr. La existencia de esta unidad de transcripción independiente explica que los niveles estacionarios de ARNr sean mayores que los de los ARNm codificados en esta misma cadena (Gaspari et al. 2004).

La maduración de los transcritos primarios policistrónicos es un proceso que requiere pocas enzimas y que se realiza de acuerdo con el modelo de puntuación por ARNs de transferencia (Montoya et al. 1981). Según este modelo, la estructura secundaria que adoptan los ARNt en los ARN policistrónicos marca los sitios de procesamiento. Tras el corte endonucleolítico realizado por ARNasas mitocondriales como la ARNasa tipo P

(ARNasa-MRP), se generan las moléculas individuales de ARNm, ARNr y ARNt. Los ARNm se poliadenilan por acción de la ARN-poliA polimerasa mitocondrial (Tomecki et al. 2004) y la maduración final de los ARNt requiere, entre otras, la actividad de la ARNt-nucleotidil transferasa (Moraes 2002).

Las diferencias observadas en cuanto a las proteínas necesarias para iniciar la transcripción del ADNmt en mamíferos y levaduras han generado cierta confusión a la hora de definir la maquinaria basal de transcripción mitocondrial (Shadel 2004). En mamíferos, el inicio de la transcripción a partir de los promotores mitocondriales requiere la presencia simultánea de la ARN-polimerasa mitocondrial, del factor de transcripción mitocondrial A y, alternativamente, del factor de transcripción mitocondrial B1 o B2 (Gaspari et al. 2004). Las cuatro proteínas que forman parte de la maquinaria basal han sido utilizadas para reconstruir *in vitro* un sistema de transcripción mitocondrial (Falkenberg et al. 2002). En levaduras, a diferencia de mamíferos, la ARN-polimerasa mitocondrial junto con un único factor de transcripción mitocondrial tipo B forma un heterodímero capaz de reconocer el promotor e iniciar la transcripción *in vitro* de forma específica (Cliften et al. 1997). Estas dos proteínas constituyen la maquinaria basal de transcripción mitocondrial en este organismo.

2.3.1. Proteínas implicadas en la transcripción del ADNmt

▪ ARN-polimerasa mitocondrial (mtRPOL)

La transcripción del ADNmt en todos los eucariotas es llevada a cabo por una única ARN-polimerasa mitocondrial. Se trata de un enzima monomérico que presenta similitud de secuencia con las ARN-polimerasas de los bacteriófagos T3, T7 y SP6. La mtRPOL no es muy selectiva y por sí sola es incapaz de interaccionar con los promotores mitocondriales. Su función requiere de factores adicionales que le permitan iniciar la transcripción de forma específica (Fisher and Clayton 1988). En los últimos años, se ha demostrado que los factores de transcripción mitocondriales tipo B en mamíferos interaccionan directamente con la mtRPOL con una estequiometría 1:1. Esta interacción facilita el inicio de la transcripción mitocondrial, pero no es necesaria durante la fase de elongación (Falkenberg et al. 2002).

Estudios recientes sugieren el acoplamiento físico y funcional de los procesos de transcripción y traducción mitocondriales en la membrana interna. Este fenómeno podría estar mediado por el extremo amino terminal (Nt) de la mtRPOL que no es requerido para el inicio de la transcripción y que contiene dominios funcionales implicados en el metabolismo del ARN (Shadel 2004). Sorprendentemente, se ha demostrado recientemente que la mtRPOL también se localiza en el núcleo, donde transcribe un grupo de genes que codifican proteínas y que poseen promotores diferentes a los reconocidos por la ARNpol II (Kravchenko et al. 2005). La implicación funcional de esta observación y su posible relación con el proceso de biogénesis mitocondrial son actualmente desconocidos.

▪ Factor de transcripción mitocondrial A (Tfam o mtTFA)

Esta proteína fue identificada originalmente en humanos donde se observó que era capaz de estimular la transcripción del ADNmt *in vitro* (Fisher and Clayton 1988). Posteriormente, se clonó el gen ortólogo a *Tfam* en levaduras denominado *Abf2p* y se comprobó que, en este sistema, esta proteína no funcionaba como un factor de transcripción sino que estaba implicada en el mantenimiento del ADNmt (Xu and Clayton 1992). La identificación de otros ortólogos de *Tfam*, como el gen *xl-mtTFA* de *Xenopus laevis* (Antoshechkin and Bogenhagen 1995), y la caracterización bioquímica de Tfam en vertebrados han revelado que se trata de una proteína abundante, de tamaño comprendido entre 25-30 kDa y muy conservada a lo largo de la evolución.

Estructuralmente Tfam presenta motivos de unión a ADN de tipo HMG (High Mobility Group) y está relacionada con las proteínas HU presentes en bacterias. Al igual que otros miembros de la familia HMG, Tfam es capaz de unirse al ADN, desenrollarlo y doblarlo sin especificidad de secuencia.

La disrupción génica de Tfam en ratón demostró que esta proteína era esencial para el mantenimiento del ADNmt en mamíferos (Larsson et al. 1998). La sobreexpresión de Tfam en este sistema se correlacionaba con un incremento en la cantidad de ADNmt pero no producía un aumento de la capacidad respiratoria ni de la masa mitocondrial (Ekstrand et al. 2004). Al mismo tiempo, se había observado que Tfam en humanos era un factor constitutivo de los nucleoides y que el ADNmt no estaba desnudo sino recubierto por esta proteína (Alam et al. 2003). Por tanto, en los organismos superiores Tfam desempeña una función dual como factor de transcripción mitocondrial y como proteína tipo histona necesaria para el mantenimiento del ADNmt. Se ha demostrado que es posible disociar *in vivo* la función de Tfam, y que es el extremo Ct de esta proteína el que le confiere actividad como factor de transcripción. La proteína Abf2p de levadura no contiene este dominio y, por tanto, no es capaz de activar la transcripción. Recientemente se ha descrito que el reconocimiento específico de los promotores mitocondriales por parte de Tfam podría estar regulado por eventos de multimerización y/o modificación post-traducciona (Shadel 2004).

En *Drosophila melanogaster*, Tfam tiene un tamaño de 30 kDa y también presenta una función dual ya que actúa como factor de transcripción mitocondrial a la vez que participa en el mantenimiento del ADNmt (Takata et al. 2001).

■ Factores de transcripción mitocondriales tipo B (mtTFB)

El primer factor de transcripción mitocondrial de este tipo se identificó en levaduras y se denominó MTF1 (Lisowsky and Michaelis 1988). Más tarde se encontró en *X.laervis* una actividad enzimática similar que, junto con xl-mtTFA, estimulaba la transcripción del ADNmt *in vitro* (Antoshechkin and Bogenhagen 1995). Con posterioridad, se han identificado los respectivos genes ortólogos en numerosos organismos.

En humanos (Falkenberg et al. 2002; McCulloch et al. 2002), y también en ratón (Rantanen et al. 2003) y en la mosca del vinagre (Matsushima et al. 2004; Matsushima et al. 2005), se han encontrado dos factores de transcripción mitocondriales tipo B denominados mtTFB1 y mtTFB2 respectivamente. Estos factores están relacionados con las ARNr-metiltransferasas bacterianas, por lo que podrían unirse a ARN o a ADN de cadena sencilla. Tanto h-mtTFB1 como h-mtTFB2 son capaces de formar un heterodímero con la mtRPOL y activar la transcripción *in vitro* en presencia de Tfam, lo cual implica que ambos pueden funcionar como factores de transcripción (Falkenberg et al. 2002). Sin embargo, h-mtTFB2 resulta casi diez veces más activo que h-mtTFB1 en la iniciación de la transcripción, lo que sugiere que estos factores podrían no ser redundantes en su función (Shadel 2004). Esta idea es compatible con los resultados del silenciamiento de estos dos genes en cultivos celulares de *Drosophila*, un trabajo que hemos realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Kaguni. El factor mtTFB2 regula la transcripción y el número de copias del ADNmt (Matsushima et al. 2004) mientras que mtTFB1 modula la traducción mitocondrial pero no la transcripción ni la cantidad de ADNmt (Matsushima et al. 2005). En consonancia con estos resultados, se ha demostrado que el factor mtTFB1 presenta actividad ARNr-metiltransferasa, independientemente de su función como factor de transcripción (Seidel-Rogol et al. 2003).

La existencia de estos dos factores de transcripción plantea la interesante cuestión del porqué de su función dual y abre la posibilidad de que la expresión del genoma mitocondrial pueda regularse a nivel

transcripcional y post-transcripcional. Es posible que mtTFB1 sea responsable de la metilación de ARNs mitocondriales y que mtTFB2 haya perdido su actividad metiltransferasa y evolucionado como un factor de transcripción especializado.

▪ Factor de terminación de la transcripción mitocondrial (mtTTF o mTERF)

Es una proteína de 34 kDa que funciona como un factor de terminación de la transcripción del ADNmt (Fernandez-Silva et al. 1997). En la molécula de ADNmt existe un sitio de unión para mTERF detrás del gen 16S rRNA y se cree que este factor es el que bloquea la transcripción de los genes localizados a continuación en la cadena H. En ratón y en humano se ha observado que mTERF se une también a los promotores (Prieto-Martin et al. 2004) y que la unión de mTERF a la molécula de ADNmt está regulada por fosforilación (Prieto-Martin et al. 2004). Muy recientemente, se ha descrito que h-mTERF es capaz de interaccionar física y simultáneamente con los sitios de inicio y terminación de la transcripción presentes en la cadena H, formando un bucle en la molécula de ADNmt que permite el reciclaje de la maquinaria de transcripción dedicada a la síntesis de los ARNr mitocondriales (Martin et al. 2005).

El gen ortólogo a *mTERF* en *Drosophila* ha sido clonado y se denomina *DmTTF* (Roberti et al. 2003). Se ha demostrado que *DmTTF* se une a dos regiones cortas, no codificantes y homólogas situadas detrás de los bloques de genes que se transcriben en ambas cadenas.

2.3.2. Mecanismo de inicio de la transcripción del ADNmt

De acuerdo con los trabajos publicados en los últimos años (McCulloch and Shadel 2003; Gaspari et al. 2004), se ha postulado que el inicio de la transcripción del ADNmt en mamíferos podría producirse del siguiente modo (Shadel 2004). En primer lugar, Tfam como tetrámero se uniría específicamente a los promotores mitocondriales y provocaría cambios conformacionales en el ADNmt que facilitarían el acceso al promotor del resto de componentes de la maquinaria basal de transcripción. A diferencia de cuando se une como monómero, el tetrámero de Tfam reconoce y se une a una secuencia específica del ADNmt y, en un proceso dependiente de secuencia, lo desenrolla parcialmente (Antoshechkin et al. 1997). Tfam es el factor que interviene en el reconocimiento especie específico del promotor por parte de cada mtRPOL (Gaspari et al. 2004). A continuación se produciría la interacción física entre un factor de transcripción mitocondrial tipo B, mtTFB1 o mtTFB2, y Tfam a través de su región Ct. Es posible que mtTFB sea reclutado al sitio de inicio de transcripción mediante la interacción con Tfam y que luego sea él mismo el que se una al ADNmt, que se encontraría como ADN de cadena sencilla. Por último, mtRPOL interaccionaría con mtTFB para formar un heterodímero, de forma que mtTFB serviría de puente entre Tfam y mtRPOL. No es descartable tampoco que la interacción entre mtTFB y mtRPOL pudiera producirse antes y que estas dos proteínas accedieran al promotor como un heterodímero. En este caso, mtTFB no necesitaría interaccionar directamente con el promotor.

2.4. Traducción del ADN mitocondrial

La función de la maquinaria de traducción mitocondrial es la síntesis de los trece polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial y que forman parte del sistema OXPHOS. Al contrario que la replicación y transcripción del ADNmt, la traducción mitocondrial es un proceso prácticamente desconocido. A pesar de los estudios realizados, todavía no se ha desarrollado un sistema que reproduzca *in vitro* la síntesis de las proteínas mitocondriales (Scheffler 1999).

Se estima que existen alrededor de 100 ribosomas por mitocondria. A excepción de los ARNr y los ARNt que están codificados por el genoma mitocondrial, el resto de componentes de la maquinaria de traducción mitocondrial están codificados en el núcleo. Los ribosomas mitocondriales presentan un bajo contenido en ARN y han retenido ciertas propiedades de su origen procariota como son la sensibilidad a cloranfenicol y la insensibilidad a cicloheximida. El mecanismo de traducción no está bien caracterizado pero se cree que es bastante similar al de procariotas. En él participan factores de iniciación y de elongación, algunos de los cuales han sido identificados (Moraes 2002).

3. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que implica la proliferación y la maduración de las mitocondrias para satisfacer en todo momento la demanda energética de las células en función de su contexto fisiológico (Garesse and Vallejo 2001). Este proceso requiere un estricto programa de expresión génica, fuertemente regulado a nivel transcripcional y traduccional, con objeto de sintetizar la cantidad adecuada de las proteínas que integran el proteoma mitocondrial, que se estima está formado por aproximadamente 1500 polipéptidos. Los mecanismos implicados en la expresión coordinada de todos estos genes se conocen a nivel transcripcional, aunque aún muy parcialmente (Scarpulla 1997). El control transcripcional está mediado por factores de transcripción generales -tipo Sp1-, factores de transcripción relativamente específicos de genes mitocondriales -como NRF-1 y NRF-2- y hormonas, fundamentalmente esteroideas y tiroideas (Goffart and Wiesner 2003). Aunque la regulación a nivel traduccional se conoce peor, la evidencia obtenida en algunos sistemas -como el hígado de rata durante el desarrollo- sugiere que puede desempeñar un papel muy relevante (Di Liegro et al. 2000).

3.1. Comunicación bidireccional núcleo-mitocondria

Puesto que la función mitocondrial requiere la expresión de genes codificados por dos genomas que se encuentran separados físicamente en dos compartimentos celulares diferentes, la biogénesis mitocondrial requiere la interacción de los genomas nuclear y mitocondrial. La necesidad de esta interacción implica la existencia de un complejo mecanismo de comunicación bidireccional entre el núcleo y la mitocondria (Poyton and McEwen 1996).

En vertebrados se han identificado dos tipos de proteínas activadoras y coactivadoras que regulan la transcripción nuclear y que son claves para la biogénesis mitocondrial (Scarpulla 2002). Numerosos trabajos han descrito a lo largo de los últimos años el papel que los factores de respiración nuclear, NRF-1 y NRF-2 (Nuclear Respiratory Factors), desempeñan en la expresión específica de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales: subunidades OXPHOS (Evans and Scarpulla 1989), enzimas de la ruta biosintética del grupo hemo (Braidotti et al. 1993) y enzimas que participan en la replicación y transcripción del ADNmt como Tfam (Virbasius and Scarpulla 1994), ARNasa-MRP (Koyama et al. 1998), mtSSB (Champagne et al. 1997) y mtTFB1 y mtTFB2 (Gleyzer et al. 2005). Los ortólogos de NRF-1 se han identificado y clonado en erizo de mar y en *Drosophila*, y se denominan P3A2 y Erect Wing respectivamente. Este último puede funcionar como activador o represor transcripcional en función del promotor que lo contenga (Fazio et al. 2001). En ratón se ha identificado el ortólogo a NRF-2 denominado GABP. Por otra parte, se ha demostrado que los coactivadores de la familia PGC-1, en respuesta a señales fisiológicas externas, integran la acción de múltiples factores de transcripción, entre ellos los NRFs, y dirigen el programa de expresión génica que

desencadena la biogénesis mitocondrial (Kelly and Scarpulla 2004).

Muy recientemente se ha descrito en *Drosophila* un nuevo sistema regulatorio que podría estar implicado en la coordinación intra e intergenómica de la expresión de genes OXPHOS y del ciclo de Krebs (Sardiello et al. 2005). Mediante un análisis informático han identificado un elemento palindrómico de ADN de 10 pb denominado NRG (Nuclear Respiratory Gene) que se encuentra en los intrones y regiones UTR de 65 genes OXPHOS y en más de 100 genes con función mitocondrial. Aunque su funcionalidad todavía tiene que ser demostrada, la existencia del elemento NRG sugiere que en mamíferos e invertebrados el control de la biogénesis mitocondrial y de la producción de energía celular se ejerce mediante circuitos genéticos diferentes.

La comunicación retrógrada mitocondria-núcleo es un fenómeno prácticamente desconocido. Según los mecanismos propuestos, este tipo de comunicación podría estar mediado por la tensión de O_2 , especies reactivas de oxígeno (ROS) o cambios en los niveles de ATP o de Ca^{+2} . Se ha observado que una de las moléculas responsables de la comunicación retrógrada de la mitocondria al núcleo en situación de estrés celular es el Ca^{+2} , el cual es capaz de inducir cambios en la expresión de genes nucleares en respuesta a alteraciones de la función mitocondrial (Biswas et al. 1999). Como ejemplo de la existencia de esta comunicación, en un trabajo reciente se demuestra la disminución coordinada de la expresión de genes nucleares y mitocondriales que codifican subunidades del complejo I de la cadena respiratoria en un mutante de *Drosophila* (Farge et al. 2004).

3.2. Factor de transcripción DREF

Originalmente el elemento DRE (DNA Replication related Element) se identificó en las regiones promotoras de los genes de *Drosophila* que codifican una subunidad de la ADN-polimerasa α y el antígeno de proliferación celular (Hirose et al. 1993). El elemento DRE es un fragmento de ADN palindrómico de 8 pb cuya secuencia es 5'-TATCGATA-3'. El factor de transcripción DREF (DRE binding Factor), que reconoce y se une al elemento DRE, es una proteína de 80 kDa cuya forma activa es como homodímero (Hirose et al. 1996). Desde un principio se observó que el efecto activador producido por DREF aumentaba de forma sinérgica respecto al número de elementos DRE contenidos en el promotor y que dicho efecto era mayor cuanto más cerca estuvieran estos sitios del inicio de transcripción. Por otra parte, se demostró que la función de DRE era menos estricta en el organismo entero que en cultivos celulares (Yamaguchi et al. 1995).

Más tarde se encontró que DRE también estaba presente en los promotores de otra serie de genes de *Drosophila* que, al igual que los anteriores, estaban relacionados con la replicación del ADNn y la proliferación celular. Además, se ha descrito que el sistema DRE/DREF regula el gen *caudal* implicado en desarrollo (Choi et al. 2004), el gen que codifica la TBP (TATA Binding Protein) que forma parte de la maquinaria basal de transcripción (Choi et al. 2000), el gen que codifica la DDB1 (DNA Damage Binding protein 1) que participa en la reparación del ADN (Takata et al. 2002), el gen de la catalasa que es un componente del sistema celular antioxidante (Park et al. 2004) y se ha visto que es esencial en embriogénesis y diferenciación (Yoshida et al. 2004). Otra observación interesante es que DREF puede interactuar con TRF-2 (TBP Related Factor 2) y funcionar como un componente de la maquinaria basal de transcripción cuya función sería la de dotar de especificidad al complejo en el reconocimiento del promotor (Hochheimer et al. 2002). Recientemente se ha identificado en humanos una proteína homóloga al factor DREF de *Drosophila* que se localiza en el núcleo y que reconoce una secuencia similar al elemento DRE (Ohshima et

al. 2003). Esta proteína es capaz de unirse al promotor del gen que codifica la histona H1 y activar su expresión. Posiblemente el ortólogo de DREF en humanos participe también en la regulación de genes implicados en proliferación celular.

Aparte de las funciones que acabamos de mencionar, trabajos de nuestro grupo y de otros han descrito que DREF regula la expresión de genes de *Drosophila* pertenecientes a la maquinaria de replicación mitocondrial, como son poly- β (Lefai et al. 2000), mtSSB (Ruiz de Mena et al. 2000) y Tfam (Takata et al. 2001). Por tanto, DREF podría ser uno de los factores de transcripción potencialmente candidatos a coordinar los procesos de biogénesis mitocondrial y proliferación celular.

4. *Drosophila melanogaster*

4.1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo y, como tal, presenta un ciclo vital dividido en dos fases diferentes: larva y adulto (Figura 3). Durante el desarrollo embrionario, que dura 24 horas aproximadamente, acontecen sucesos morfogénicos importantes y se establece el patrón corporal segmentado del animal. A continuación, tiene lugar la fase de vida larvaria en la que se distinguen tres estadios de desarrollo y durante la cual se producen dos mudas de las estructuras cuticulares. El 1^{er} estadio larvario tiene una duración de 24 horas y finaliza con la primera muda. El 2^o estadio larvario transcurre durante las siguientes 24 horas y, tras la segunda muda, comienza el 3^{er} estadio larvario de dos días de duración. La transición de larva a adulto se inicia con la pupación de la larva en torno al sexto día de desarrollo. En este momento, *Drosophila* sufre un proceso de metamorfosis en el que se histolizan la mayoría de los tejidos larvarios y, a partir de los primordios o discos imaginales, se generan las estructuras que darán lugar a la mosca adulta. El imago emerge del pupario aproximadamente tres días después. El proceso de desarrollo de *D. melanogaster*, desde la formación del embrión hasta la eclosión del imago, tiene una duración aproximada de 9 días a 25°C (Bodenstein 1994).

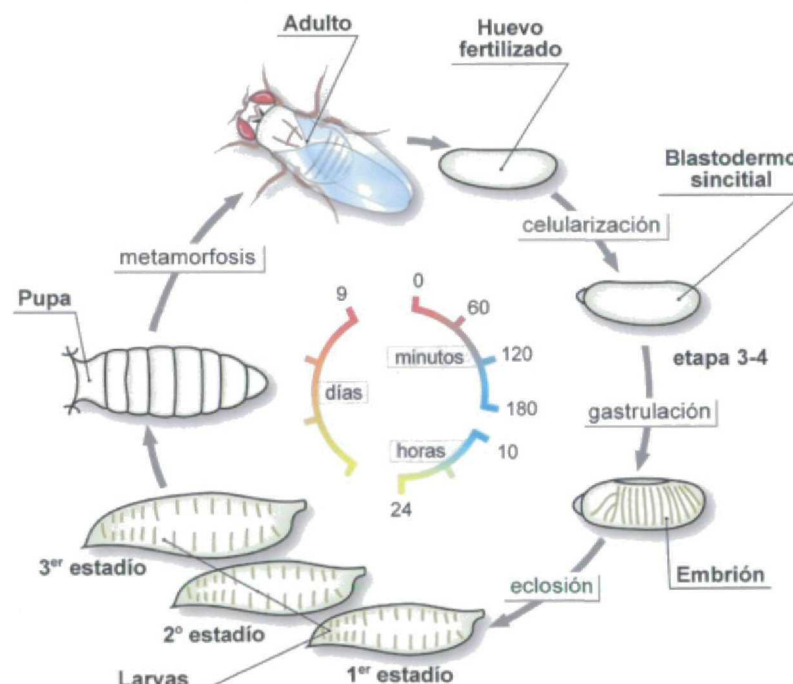


Figura 3. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*.

4.2. Función de las hormonas en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Diversos procesos de la biología de los insectos tales como el desarrollo, el crecimiento y la reproducción son dependientes de esteroides. En *D. melanogaster*, las principales transiciones a lo largo del desarrollo están mediadas específicamente por un tipo de hormona esteroidea denominada ecdisona (Thummel 2001). Esta hormona se produce en las glándulas protorácicas y su síntesis está inducida por la hormona protoracicotrópica (PTTH). La ecdisona se libera en forma inactiva y en los tejidos periféricos se convierte en su forma activa como 20-hidroxiecdisona (20-HE). La cuantificación de los niveles de ecdisona a lo largo del ciclo vital de *D. melanogaster* demuestra que existen picos de hormona en las transiciones entre los estadios y al inicio de la formación del pupario, la pupación y la metamorfosis (Figura 4). La PTTH se sintetiza en las células neurosecretoras de la región dorsolateral de los hemisferios cerebrales y su producción está regulada por el tamaño del organismo y por los ritmos circadianos.

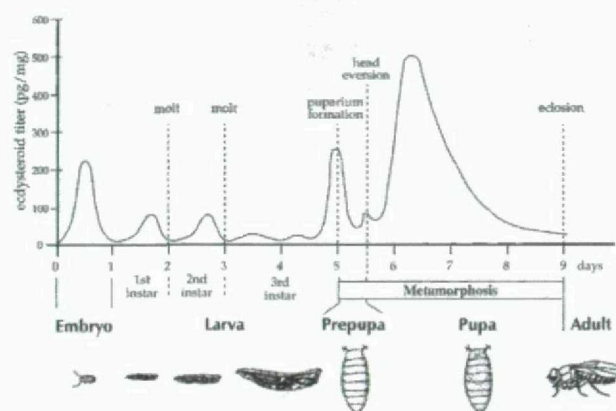


Figura 4. Niveles de la hormona ecdisona a lo largo del desarrollo de *D. melanogaster* (Thummel 2001).

Otra hormona que desempeña un papel importante en el desarrollo de *D. melanogaster* es la hormona juvenil (JH). Esta hormona es un sesquiterpeno sintetizado en el *corpora allata* y previene el inicio de la metamorfosis durante el crecimiento larvario. Por tanto, el balance entre la señalización mediada por 20-HE y JH es el que va a determinar la progresión a lo largo del desarrollo de *D. melanogaster* (Riddiford 1993).

4.3. *Drosophila melanogaster* como sistema modelo

Los primeros estudios sobre Genética en los que se utilizó *D. melanogaster* como modelo animal se remontan al año 1909. Morgan y su grupo escogieron este sistema como modelo por tratarse de un organismo muy prolífico, de ciclo vital corto, con una organización cromosómica sencilla y cuyo cultivo resultaba fácil y de escaso coste económico (Echalier 1997). Durante todo el siglo XX estos estudios continuaron y el avance en el conocimiento de la genética y el desarrollo de este organismo ha sido exponencial (Ashburner 2005). En la actualidad se ha completado la secuenciación del genoma de *D. melanogaster* y se trabaja en el de otras especies de *Drosophila* (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). Este contexto ha propiciado la aparición de un gran número de técnicas genéticas y moleculares que han permitido estudiar en detalle procesos biológicos complejos utilizando *Drosophila* como modelo (Venken and Bellen 2005). La sistematización de las técnicas de transformación mediada por elementos P (Spradling and Rubin 1982) ha permitido la generación de una larga colección de mutantes que se encuentran disponibles en el *Drosophila* Bloomington Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). En la década de los 90, se desarrolló una potente herramienta experimental basada en el sistema UAS-GAL4 de levadura para estudiar *in vivo* la función de genes de interés (Brand and

Perrimon 1993). Aunque originalmente fue ideado para generar fenotipos de ganancia de función mediante la sobreexpresión del gen sujeto a estudio, la lista de aplicaciones del sistema UAS-GAL4 se ha diversificado enormemente en los últimos años (Duffy 2002). Recientemente se ha puesto a punto en *Drosophila* la técnica de recombinación homóloga para obtener “knock-outs” y “knock-ins” de los genes diana (Rong and Golic 2001; Rong et al. 2002) así como la estrategia de interferencia de ARN (RNAi) para generar “knock-downs” del gen de interés (Kennerdell and Carthew 2000).

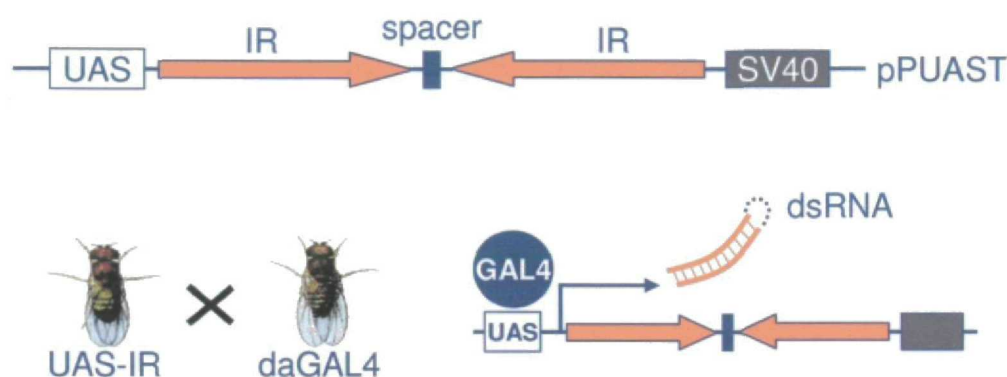


Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento del sistema UAS-GAL4. Por una parte, este sistema consta de líneas transgénicas denominadas “driver” GAL4 que expresan el factor de transcripción GAL4 bajo el control de promotores específicos. Por otra parte, consta de líneas transgénicas denominadas UAS que contienen el gen de interés o un ARN específico, como se muestra en el esquema, bajo el control de elementos UAS. Sólo en la descendencia del cruce de las líneas UAS con las líneas GAL4 se producirá la expresión del transgén regulado por el sistema UAS-GAL4. En la actualidad existe una enorme batería de líneas GAL4 que dirigen la expresión del gen o ARN de interés de forma específica a la mayor parte de los tipos celulares y tejidos de *D.melanogaster* (<http://flystocks.bio.indiana.edu/gal4.htm>).

El sistema UAS-GAL4 se puede utilizar para expresar *in vivo* repeticiones invertidas (IR) de fragmentos del gen de interés (Figura 5). Una vez transcritas, las repeticiones invertidas producen ARN de doble cadena y desencadenan el mecanismo de interferencia de ARN (RNAi), generando así fenotipos de pérdida de función.

5. INTERFERENCIA DE ARN (RNAi)

La primera evidencia del fenómeno de silenciamiento de ARN se observó en plantas (Jorgensen 2003) y, posteriormente, se descubrió que este proceso ocurría de forma natural en la mayoría de los organismos eucariotas (Cogoni and Macino 2000). Su función está relacionada con la protección frente a inserciones de elementos móviles procedentes de virus y transposones, generalmente en forma de ARN, en el genoma de células eucariotas, así como con la regulación del programa genético a lo largo del desarrollo de organismos superiores (Agrawal et al. 2003). El silenciamiento de genes que ocurre de forma natural en los eucariotas puede producirse a tres niveles diferentes: represión traduccional, ruptura endonucleolítica del ARNm y heterocromatinización (Meister and Tuschl 2004).

En 1998, Fire et al. descubrieron la naturaleza de la molécula responsable del silenciamiento de genes. Introdujeron en *C.elegans* distintos ARN de doble cadena (dsRNA) que correspondían a fragmentos de los genes que escogieron como diana y observaron fenotipos de pérdida de función específicos (Fire et al. 1998). Este experimento sentaba las bases de una nueva técnica experimental que iba a permitir el silenciamiento de genes mediante la aplicación exógena de dsRNA y a la que se denominó interferencia de ARN (RNAi).

El mecanismo funcional de RNAi ha sido estudiado exhaustivamente en los últimos años y presenta

variaciones de unas especies a otras (Figura 6). En la mayoría de los eucariotas el proceso de RNAi consta de dos etapas. La primera etapa implica la degradación del dsRNA en pequeños fragmentos de dsRNA de 21-27 pb por la acción de una ribonucleasa de tipo III denominada Dicer. En *D.melanogaster* existen dos isoformas de Dicer y es la isoforma Dicer-2 la que genera siRNAs (small interfering RNAs) a partir de dsRNA exógenos. La segunda etapa consiste en el ensamblaje del complejo de silenciamiento RISC (RNA-induced silencing complex). La formación del RISC es un proceso complejo que sólo ha sido estudiado *in vitro* en *Drosophila* y, por tanto, se desconoce si lo establecido para esta especie puede generalizarse a otras. En *D.melanogaster* los siRNAs interaccionan con el heterodímero Dicer-2:R2D2 y, a continuación, reclutan la proteína Argonaute 2 junto con una serie de factores auxiliares para formar el complejo RISC. Estas proteínas median la desnaturalización de los siRNAs, la degradación de una de las dos cadenas de ARN y la entrada al complejo RISC del ARNm diana, el cual es procesado por un único corte endonucleolítico ejecutado por Argonaute-2 (Tomari and Zamore 2005). Se han identificado algunos componentes del complejo RISC en otras especies pero todavía existen muchas cuestiones acerca del mecanismo de RNAi que deben ser resueltas.

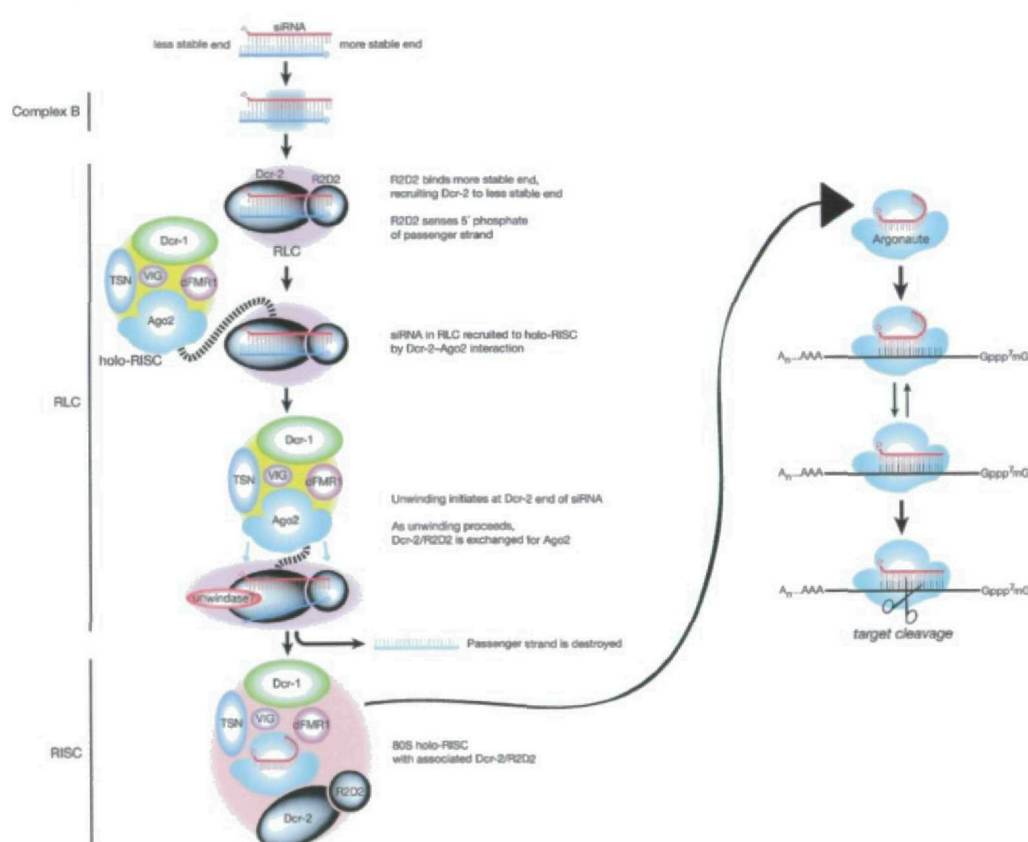


Figura 6. Mecanismo de interferencia de ARN (RNAi) en *D.melanogaster* (Tomari and Zamore 2005).

La interferencia de ARN y su aplicación en el silenciamiento de genes de interés se han convertido en una elegante herramienta para el estudio de la función génica en diversos organismos. En *Drosophila*, la técnica de RNAi ha sido puesta a punto tanto en células en cultivo como en el animal entero. En este trabajo hemos empleado esta estrategia experimental para estudiar la función de los factores de transcripción mitocondriales B1 y B2 *in vivo* utilizando *D.melanogaster* como modelo animal.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Durante los últimos años se ha producido un importante cambio en nuestra visión de las mitocondrias al identificarse que, además de su tradicional función metabólica, desempeñan un importante papel en procesos como la homeostasis del calcio intracelular y la muerte celular programada o apoptosis. Por tanto, la mitocondria es un orgánulo esencial en la fisiología de la célula eucariótica. La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que requiere la expresión coordinada de un amplio número de genes localizados en dos compartimentos celulares diferentes, núcleo y mitocondria. A pesar de su importancia, los mecanismos que regulan este proceso son prácticamente desconocidos.

La viabilidad de un organismo depende, entre otros factores, de la disponibilidad energética de cada una de las células que lo componen. El proceso de biogénesis mitocondrial garantiza que cada célula contenga la cantidad adecuada de mitocondrias en función de su contexto fisiológico. Se sabe que la generación de nuevas mitocondrias se produce por la fisión de las mitocondrias existentes y que requiere la replicación previa del genoma mitocondrial para que las mitocondrias hijas dispongan de un número suficiente de copias de la molécula de ADNmt. En este proceso intervienen numerosos genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, la mayoría de los cuales se han identificado recientemente.

En este contexto, en esta tesis doctoral nos propusimos estudiar algunos aspectos básicos del proceso de biogénesis mitocondrial relacionados con la replicación y la transcripción del ADNmt utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo.

Los objetivos concretos que nos planteamos fueron los siguientes:

- Caracterizar las regiones promotoras de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF* con el propósito de identificar elementos reguladores comunes que potencialmente participen en la expresión coordinada de todos ellos.
- Analizar la función que desempeña el sistema DRE/DREF en la expresión de estos genes ya que, aunque originalmente se había descrito que el factor de transcripción DREF regulaba la expresión de genes relacionados con la replicación del ADNn y la proliferación celular, también se conoce que participa en la expresión de algunos genes implicados en la replicación del ADNmt.
- Realizar un análisis funcional *in vivo* de los factores de transcripción mitocondriales tipo B mediante la interferencia de ARN de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2*, con objeto de determinar la función de cada uno de ellos en el proceso de transcripción del ADNmt.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Reactivos, soluciones y tampones

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para la biología molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o, en su defecto, en las citas correspondientes.

1.2. Líneas de *Drosophila melanogaster*

Además de las líneas transgénicas generadas durante el desarrollo de este trabajo, se han utilizado las siguientes líneas de *Drosophila melanogaster*, la mayoría de ellas amablemente cedidas por el Dr. Manuel Calleja.

- Oregon R
- yw
- w;CyO/If;TM6,Tb/MKRS
- w;UASlacZ/UASlacZ
- w;UASgfp/UASgfp
- w;CyO/UASgfp,apGAL4
- w;+/-;daGAL4/daGAL4. Obtenida del Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana University.
- w;CyO/If;24B/24B
- w;1407HM/1407HM;+/-

1.3. Líneas celulares

En los experimentos de transfección se ha utilizado la línea celular Schneider S2, establecida a partir de embriones de la cepa Oregon R de *Drosophila melanogaster* (Schneider 1972).

1.4. Cepas de bacterias

Se han empleado las siguientes cepas bacterianas de *E.coli*:

- DH5 α . Utilizada para transformación y crecimiento de plásmidos en general (Sambrook and Russell 2001).
- SURE (Stratagene). Utilizada para el clonaje de fragmentos de ADN en construcciones con repeticiones invertidas para minimizar el fenómeno de recombinación.

1.5. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Isogen (Holanda). En las siguientes tablas se especifica el nombre, la secuencia en dirección 5'>3', el tamaño, las dianas para enzimas de restricción en caso de contenerlas y la aplicación principal para la que fueron diseñados. Las mutaciones introducidas, en caso de haberlas, se destacan en negrita. No se incluyen los oligonucleótidos generales T3, T7, Sp6, M13 (-20) directo, M13/pUC reverso.

1.5.1. Oligonucleótidos empleados en el estudio de las regiones promotoras

Nombre	Secuencia	Diana	N	Aplicación
luc	GCGTCTTCCATTTTACC		17	secuenciación
pACT 5C	GCCGCTCCATCAGCCAGC		18	secuenciación
GFP	TGTTGGCCATGGAACAGGT		19	secuenciación
6564	CACCCGTCGCTTGTACGT		21	mtH RACE externo
6565	CCAGCAGCCCATGATCGGT		19	mtH RACE interno
6645	GGATCCTGATGATGTTAGGTCGGGT	BamHI	25	mtH promotor 2000 d
6646	CTCGAGGTTATCGATATCGAAAGTGA	XhoI	26	mtH promotor+5'UTR r
7847	GGATCCTTAAAAAGTGGCACACGT	BamHI	24	mtH promotor 1910
9126	CCGGATCCTAGATCACC GAAGACAGCGATA	BamHI	30	mtH promotor 1860
7849	GGATCCGTATTTTATGAATGATTTAATGA	BamHI	29	mtH promotor 1790
6730	GGATCCTGGTGGAAGAGCCGCA	BamHI	24	mtH promotor 320
6731	GGATCCTGAATTTACCGTGCTTAACT	BamHI	26	mtH promotor 230
6732	CTCGAGGTTATTAGTATCGAAAGTGA	XhoI	26	mtH mut dre prox
6733	CTCGAGGTTATCGATATTAGAAGTGA	XhoI	26	mtH mut dre prox
6734	CTCGAGGTTATTAGTATTAGAAGTGA	XhoI	26	mtH mut dre prox
8425	CTAAGCTTATAACATGGAAAATGAGACGCG	HindIII	30	mtH localización subcelular
9800	CCTCATGAAGTTCTCGGATGGCGTCT	BspHI	26	mtH localización subcelular
1855	TAGATCACC GAAGACAGCGATAGGCAATCGATACATCGAA		40	mtH retardo dre distal
1856	TTCGATGTATCGATTGCCTATCGCTGTCTTCGGTGATCTA		40	mtH retardo dre distal
1857	TAGATCACC GAAGACAGTAGTAGGCAATCGATACATCGAA		40	mtH retardo dre distal
1858	TTCGATGTATCGATTGCCTACTACTGTCTTCGGTGATCTA		40	mtH retardo dre distal
1859	TAGATCACC GAAGACAGTAGTAGGCAATTAGTACATCGAA		40	mtH retardo dre distal
1860	TTCGATGTACTAATTGCCTACTACTGTCTTCGGTGATCTA		40	mtH retardo dre distal
1861	TAGATCACC GAAGACAGCGATAGGCAATTAGTACATCGAA		40	mtH retardo dre distal
1862	TTCGATGTACTAATTGCCTATCGCTGTCTTCGGTGATCTA		40	mtH retardo dre distal
1863	TTTCCACCCCTCACTTTTCGATATCGATAACATGGAAAATG		40	mtH retardo dre prox
1864	CATTTTCCATGTTATCGATATCGAAAGTGAGGGGTGGAAA		40	mtH retardo dre prox
1865	TTTCCACCCCTCACTTTTAGTATCGATAACATGGAAAATG		40	mtH retardo dre prox
1866	CATTTTCCATGTTATCGATACTAAAAGTGAGGGGTGGAAA		40	mtH retardo dre prox
1867	TTTCCACCCCTCACTTTTAGTATTGATAACATGGAAAATG		40	mtH retardo dre prox
1868	CATTTTCCATGTTACTAATACTAAAAGTGAGGGGTGGAAA		40	mtH retardo dre prox
1869	TTTCCACCCCTCACTTTTCGATATTAGTAACATGGAAAATG		40	mtH retardo dre prox
1870	CATTTTCCATGTTACTAATATCGAAAGTGAGGGGTGGAAA		40	mtH retardo dre prox
6409	GCCGTAGATGGCCAAAACGG		20	B1 RACE externo
6410	CGGAGACACCCAAAGCGCC		19	B1 RACE interno
6461	CCGTCGACGAAAGTGCAAGTGTCTATCG	Sall	27	B1 promotor 2000
6462	CCAGATCTGCAGCTGACCGTCAGATAG	BglII	27	B1 promotor+5'UTR r
6463	CCAGATCTGCAAGCGTATTATATAAAAG	BglII	28	B1 promotor +1 r
7068	CGTCGACCGAAAATGATGATGATTGAAG	Sall	28	B1 promotor 325
9439	CCAAGCTTCGGCCACACTATTACCGT	HindIII	26	B1 localización subcelular
9441	CCCCATGGTCCGCTGTGAGGTGTCC	NcoI	25	B1 localización subcelular
7648	CCTCCGAATTTGCAATGTAC		20	B2 RACE externo
7649	TGTGAGTGGAACCTTTTGC		20	B2 RACE interno
7861	GTCGACCGGGCGGACTGGATGA	Sall	22	B2 promotor 2000
7862	AGATCTTTCTTAAGATTTTAAACAAATTGA	BglII	30	B2 promotor+5'UTR r
9154	CCGGATCCTGACCCATGCCAAAAATATAT	BamHI	29	B2 promotor 150
9155	CCGGATCCTATGTTTTCGAATCAGCTGTT	BamHI	29	B2 promotor 50
844	CCAAGCTTTATGTTTTCGAATCAGCTGTT CGTTATGCTATTAGTAAGT	HindIII	48	B2 mut dre
9445	CCAAGCTTAATTACCGGGTAGTGTTGTTA	HindIII	29	B2 localización subcelular
9446	CCTCATGACATCACTCAGGAGATCCG	BspHI	26	B2 localización subcelular
1871	CAGCTGTTCTGTTATGCTATCGATAAGTTATTGGGTTTTCG		40	B2 retardo

Nombre	Secuencia	Diana	N	Aplicación
1872	GCAAAACCCAATAACTTATCGATAGCATAACGAACAGCTG		40	B2 retardo
1873	CAGCTGTTTCGTTATGCTATTAGTAAGTTATTGGGTTTTGC		40	B2 retardo
1874	GCAAAACCCAATAACTTACTAATAGCATAACGAACAGCTG		40	B2 retardo
1338	GATACTGGGCTATCCGGATCCCTTCAATTGTCATTGTCATT	BamHI	42	DmTTF VSVG p2000
1339	CCGGATCCCTTCAATTGTCATTGTCATT	BamHI	29	DmTTF promotor 2000
818	GGCTCGAGCCCGAATTGCTTAATTTACA	XhoI	29	DmTTF promotor+5'UTR r
1299	CCAAGCTTAACTAGTTAACGCAATTAAGCAGC	HindIII	32	DmTTF promotor 1300
1298	CCAAGCTTTGTTCAAAATCCTACAAGTC	HindIII	28	DmTTF promotor 400
2875	CCAAGCTTTGTTCAAAATCCTACAAGTCTTTGTTT AGTAGTAATGTTCCG	HindIII	50	DmTTF mut dre
1839	TCATTATTTTCAAAACCGATAATAGTAATTGTTTGA		36	DmTTF mut dre / retardo
820	TCAAACAATTACTATTATCGGTTTTGAAAATAATGA		36	DmTTF mut dre / retardo
1840	TCATTATTTTCAAACTAGTAACGATAATTGTTTGA		36	DmTTF mut dre / retardo
821	TCAAACAATTATCGTTACTAGTTTTGAAAATAATGA		36	DmTTF mut dre / retardo
1841	TCATTATTTTCAAACTAGTAATAGTAATTGTTTGA		36	DmTTF mut dre / retardo
822	TCAAACAATTACTATTACTAGTTTTGAAAATAATGA		36	DmTTF mut dre / retardo
1838	TCATTATTTTCAAACTAGTAATTGTTTGA		30	DmTTF mut dre / retardo
1263	TCAAACAATTACTAGTTTTGAAAATAATGA		30	DmTTF mut dre / retardo
1875	TCATTATTTTCAAAACCGATAATTGTTTGA		30	DmTTF retardo
1876	TCAAACAATTATCGGTTTTGAAAATAATGA		30	DmTTF retardo
1877	TCATTATTTTCATTCCGATAACGATAATTGTTTGA		36	DmTTF retardo
1878	TCAAACAATTATCGTTATCGGTTTTGAAAATAATGA		36	DmTTF retardo

1.5.2. Oligonucleótidos empleados en la interferencia de ARN de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2*

Nombre	Secuencia	N	Aplicación
pPUAST d	CCAATTATGTCACACCACAGA	21	secuenciación clones RNAi
pPUAST r	CTGCAACTACTGAAATCTGCC	21	secuenciación clones RNAi
8514	CGATCCCGAATTCAAAAAGCT	21	secuenciación UAS-IR
8515	AGCTTTTTGAATTCGGGATCG	21	secuenciación UAS-IR
1651	AGGTGTTACTAAAGGAGTTGCTGG	24	sonda Cytb/ND6 dir
1652	TACGTAACATCTTTAGCCTCTAATG	25	sonda Cytb/ND6 rev
1653	AGGAGCTGCTATATTAGCTG	20	sonda ND4 dir
1654	CAGCCAGAACGTTTACAAGC	20	sonda ND4 rev
1655	GACCATCCGCCAGCATAC	19	sonda RP49 dir
1656	AGAACGGAGGCGACCGTTG	19	sonda RP49 rev
1659	ACACACGGAACACGAATGCTCG	22	sonda cluster histonas dir
1660	AGCGAAGCCAAAGCCTGTAGTAGC	24	sonda cluster histonas rev
9466	GAGTCCGCGTAACACCTATCAAA	23	qRT-PCR rpIII 140kDa dir
9467	ACAAGTGGCTTCATCGGATAGTAAAG	26	qRT-PCR rpIII 140kDa rev
9468	CCCAGAAAGCGTTTACAGAT	20	qRT-PCR mtTFB2 dir
9469	GAGATGTATGTATATGGGTG	20	qRT-PCR mtTFB2 rev
9470	GCACAACAGGATGGCCCAA	19	qRT-PCR mtTFB1 dir
9471	CGCTCGTCCATGAGGAAG	18	qRT-PCR mtTFB1 rev

1.6. Vectores

- pBluescript II KS+ (Stratagene). Utilizado para el clonaje y la amplificación de fragmentos de ADN.
- pGEMT-Easy (Promega). Utilizado para el clonaje y la amplificación de productos de PCR.
- pIJ2925 (Janssen and Bibb 1993). Utilizado para el clonaje de las proteínas fusión con GFP en el estudio de localización subcelular de los distintos genes.
- pxp2 (Nordeen 1988). Contiene el gen testigo *luciferasa* y un sitio múltiple de clonaje. Utilizado para el análisis funcional de las regiones promotoras de los genes estudiados en ensayos de transfección transitoria en células en cultivo.

- pAc5.1/V-5-His/lacZ (Invitrogen). Contiene el gen testigo *lacZ* bajo el control del promotor del gen de la actina 5C. Utilizado para normalizar la eficiencia de transfección en ensayos de transfección transitoria en células en cultivo.
- pPUAST (Brand and Perrimon 1993). Contiene un elemento P, el gen de selección *white* y permite la expresión del inserto clonado bajo el control del sistema UAS-GAL4. Utilizado en la transformación de *Drosophila* para el análisis *in vivo* de la función de distintos genes mediante interferencia de ARN.
- pUChs π Δ2-3. Contiene el gen de la *transposasa*. Utilizado en la generación de moscas transgénicas mediada por elementos P.

1.7. Clones

1.7.1. Clones generados para el estudio de las regiones promotoras

1.7.1.1. Gen *d-mthelicasa*

- pxp2:p2000 mtH. Contiene la región promotora de 2 kb del gen *d-mthelicasa* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1910 mtH. Contiene la región promotora de 1910 pb del gen *d-mthelicasa* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1860 mtH. Contiene la región promotora de 1860 pb del gen *d-mthelicasa* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1790 mtH. Contiene la región promotora de 1790 pb del gen *d-mthelicasa* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1660 mtH. Contiene la región promotora de 1660 pb del gen *d-mthelicasa* obtenida por digestión ΔNcoI/XhoI a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/XhoI.
- pxp2:p935 mtH. Contiene la región promotora de 935 pb del gen *d-mthelicasa* obtenida por digestión ΔPstI/XhoI a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/XhoI.
- pxp2:p610 mtH. Contiene la región promotora de 610 pb del gen *d-mthelicasa* obtenida por digestión DraI/XhoI a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/XhoI.
- pxp2:p560 mtH. Contiene la región promotora de 560 pb del gen *d-mthelicasa* obtenida por digestión ΔHindIII/XhoI a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/XhoI.
- pxp2:p420 mtH. Contiene la región promotora de 420 pb del gen *d-mthelicasa* obtenida por digestión BglII/XhoI a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido BamHI/XhoI.
- pxp2:p320 mtH. Contiene la región promotora de 320 pb del gen *d-mthelicasa* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p230 mtH. Contiene la región promotora de 230 pb del gen *d-mthelicasa* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p2000 mutOX mtH. Contiene la región promotora de 2000 pb del gen *d-mthelicasa* con uno de los dos sitios DRE proximales mutagenizado. El inserto se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 6645/6732 y se clonó en las dianas BamHI/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p2000 mutXO mtH. Contiene la región promotora de 2000 pb del gen *d-mthelicasa* con uno de los dos sitios DRE proximales mutagenizado. El inserto se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 6645/6733 y se clonó en las dianas BamHI/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p2000 mutXX mtH. Contiene la región promotora de 2000 pb del gen *d-mthelicasa* con los dos sitios DRE proximales mutagenizados. El inserto se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 6645/6734 y se clonó en las dianas BamHI/XhoI del vector pxp2.
- pIJ2925:mtH:GFP. Contiene el ADNc completo del gen *d-mthelicasa* digerido ΔHindIII/BspHI y

fusionado en fase con el ADNc de la proteína verde fluorescente (GFP), seguido de la señal de poliadenilación del SV40 y bajo control del promotor del gen de la actina 5C.

1.7.1.2. Gen *d-mtTFB1*

- pxp2:p2kb B1. Contiene la región promotora de 2 kb del gen *d-mtTFB1* amplificada por PCR y clonada en las dianas Sall y BglII del vector pxp2.
- pxp2:p2kb B1:5'UTR B1. Contiene, además de la región promotora de 2 kb del gen *d-mtTFB1*, la región 5'UTR. El fragmento completo fue amplificado por PCR y clonado en las dianas Sall y BglII del vector pxp2.
- pxp2:p2kb B1:5'UTR B1 (inv). Contiene, además de la región promotora de 2 kb del gen *d-mtTFB1*, la región 5'UTR clonada en sentido inverso en el vector pxp2.
- pxp2:p1kb α ATPasa. Contiene la región promotora de 1 kb del gen α ATPasa clonada en la diana Sall del vector pxp2.
- pxp2:p1kb α ATPasa:5'UTR B1. Construcción quimérica que contiene la región promotora de 1 kb del gen α ATPasa seguida de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1*.
- pxp2:p1kb α ATPasa:5'UTR B1 (inv). Construcción quimérica que contiene la región promotora de 1 kb del gen α ATPasa seguida de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1* clonada en sentido inverso.
- pxp2:p1kb β ATPasa. Contiene la región promotora de 1 kb del gen β ATPasa clonada en la diana Sall del vector pxp2.
- pxp2:p1kb β ATPasa:5'UTR B1. Construcción quimérica que contiene la región promotora de 1 kb del gen β ATPasa seguida de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1*.
- pxp2:p1kb β ATPasa:5'UTR B1 (inv). Construcción quimérica que contiene la región promotora de 1 kb del gen β ATPasa seguida de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1* clonada en sentido inverso.
- pxp2:p1700 B1. Contiene la región promotora de 1700 pb del gen *d-mtTFB1* obtenida por digestión HindIII/BglII a partir de la construcción pxp2:p2kb B1:5'UTR B1 y clonada en el vector pxp2 digerido HindIII/BglII.
- pxp2:p1166 B1. Contiene la región promotora de 1166 pb del gen *d-mtTFB1* obtenida por digestión DraI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/BglII.
- pxp2:p737 B1. Contiene la región promotora de 737 pb del gen *d-mtTFB1* obtenida por digestión Δ NcoI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/BglII.
- pxp2:p503 B1. Contiene la región promotora de 503 pb del gen *d-mtTFB1* obtenida por digestión XhoI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido Sall/BglII.
- pxp2:p325 B1. Contiene la región promotora de 325 pb del gen *d-mtTFB1* obtenida por PCR y clonada en el vector pxp2 digerido Sall/BglII.
- pxp2:p113 B1. Contiene la región promotora de 113 pb del gen *d-mtTFB1* obtenida por digestión HincII/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/BglII.
- pIJ2925:mtTFB1:GFP. Contiene la región 5'UTR y el ADNc comprendido entre las posiciones +1 y +403 del gen *d-mtTFB1*. Este fragmento se obtuvo por digestión HindIII/NcoI y se fusionó en fase con el ADNc de la proteína verde fluorescente (GFP), seguido de la señal de poliadenilación del SV40 y bajo control del promotor del gen de la actina 5C.

1.7.1.3. Gen *d-mtTFB2*

- pxp2:p2000 B2. Contiene la región promotora de 2 kb y la región 5'UTR del gen *d-mtTFB2* amplificadas por PCR y clonadas en las dianas Sall y BglII del vector pxp2.
- pxp2:p1510 B2. Contiene la región promotora de 1510 pb del gen *d-mtTFB2* obtenida por digestión Δ XbaI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/BglII.
- pxp2:p840 B2. Contiene la región promotora de 840 pb del gen *d-mtTFB2* obtenida por digestión DraI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido SmaI/BglII.
- pxp2:p360 B2. Contiene la región promotora de 360 pb del gen *d-mtTFB2* obtenida por digestión BamHI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido BamHI/BglII.

- pxp2:p230 B2. Contiene la región promotora de 230 pb del gen *d-mtTFB2* obtenida por digestión XhoI/BglII a partir de la construcción anterior y clonada en el vector pxp2 digerido Sall/BglII.
- pxp2:p150 B2. Contiene la región promotora de 150 pb del gen *d-mtTFB2* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y BglII del vector pxp2.
- pxp2:p50 B2. Contiene la región promotora de 50 pb del gen *d-mtTFB2* amplificada por PCR y clonada en las dianas BamHI y BglII del vector pxp2.
- pxp2:p50 mut B2. Contiene la región promotora de 50 pb del gen *d-mtTFB2* con el sitio DRE mutagenizado. El inserto se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 844/7862 y se clonó en las dianas HindIII/BglII del vector pxp2.
- pIJ2925:mtTFB2:GFP. Contiene la región 5'UTR y el ADNc comprendido entre las posiciones +1 y +451 del gen *d-mtTFB1*. Este fragmento se obtuvo por digestión HindIII/BspHI y se fusionó en fase con el ADNc de la proteína verde fluorescente (GFP), seguido de la señal de poliadenilación del SV40 y bajo control del promotor del gen de la actina 5C.

1.7.1.4. Gen *DmTTF*

- pxp2:p1770 *DmTTF*. Contiene la región promotora de 1770 pb y la región 5'UTR del gen *DmTTF* amplificadas por PCR y clonadas en las dianas BamHI y XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1300 *DmTTF*. Contiene la región promotora de 1300 pb del gen *DmTTF* obtenida por PCR y clonada en el vector pxp2 digerido HindIII/XhoI.
- pxp2:p400 *DmTTF*. Contiene la región promotora de 400 pb del gen *DmTTF* obtenida por PCR y clonada en el vector pxp2 digerido HindIII/XhoI.
- pxp2:p1770 mutOX *DmTTF*. Contiene la región promotora de 1770 pb del gen *DmTTF* con uno de los dos sitios DRE proximales mutagenizado. La mutagénesis se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos 1339/820 y 1839/818 y se clonó en las dianas BamHI/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1770 mutXO *DmTTF*. Contiene la región promotora de 1770 pb del gen *DmTTF* con uno de los dos sitios DRE proximales mutagenizado. La mutagénesis se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos 1339/821 y 1840/818 y se clonó en las dianas BamHI/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p1770 mutXX *DmTTF*. Contiene la región promotora de 1770 pb del gen *DmTTF* con los dos sitios DRE proximales mutagenizados. La mutagénesis se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos 1339/822 y 1841/818 y se clonó en las dianas BamHI/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p400 mutXOO *DmTTF*. Contiene la región promotora de 400 pb del gen *DmTTF* con el sitio DRE distal mutagenizado. El inserto se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 2875/818 y se clonó en las dianas HindIII/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p400 mutOXX *DmTTF*. Contiene la región promotora de 400 pb del gen *DmTTF* con los dos sitios DRE proximales mutagenizados. El inserto se obtuvo por PCR utilizando como molde la construcción pxp2:p1770 mutXX *DmTTF* y los oligonucleótidos 1298/818 y se clonó en las dianas HindIII/XhoI del vector pxp2.
- pxp2:p400 mutXXX *DmTTF*. Contiene la región promotora de 400 pb del gen *DmTTF* con el sitio DRE distal y los sitios DRE proximales mutagenizados. El inserto se obtuvo por PCR utilizando como molde la construcción pxp2:p1770 mutXX *DmTTF* y los oligonucleótidos 2875/818 y se clonó en las dianas HindIII/XhoI del vector pxp2.

1.7.2. Clones generados para la interferencia de ARN de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2*

Estas construcciones fueron diseñadas y preparadas en el laboratorio de la Dra. L.Kaguni en East Lansing University (Michigan, EE.UU.).

- pPUAST:IR-B1. Contiene dos repeticiones invertidas de un fragmento de 700 pb del ADNc del gen *d-mtTFB1* comprendido entre las posiciones +645 y +1345 clonado en las dianas XbaI/XhoI del vector pPUAST.
- pPUAST:IR-B2. Contiene dos repeticiones invertidas de un fragmento de 365 pb del ADNc del gen *d-mtTFB2* comprendido entre las posiciones +866 y +1230 clonado en las dianas XbaI/XhoI del vector pPUAST.

1.8. Sondas

- CytB-ND6. Fragmento que contiene los genes *citocromo b* y *ND6*, ambos codificados en el genoma mitocondrial. Se obtuvo por amplificación por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Drosophila melanogaster* y los oligonucleótidos 1651 y 1652.
- ND4. Fragmento del gen que codifica la subunidad 4 del complejo NADH-coenzima Q oxidoreductasa en el genoma mitocondrial. Se obtuvo por amplificación por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Drosophila melanogaster* y los oligonucleótidos 1653 y 1654.
- RP49. Fragmento del gen que codifica la proteína ribosomal 49 (RP49), de expresión constitutiva. Se obtuvo por amplificación por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Drosophila melanogaster* y los oligonucleótidos 1655 y 1656.
- Histonas. Fragmento que contiene una región del “cluster” de genes nucleares que codifican las proteínas tipo histona. Se obtuvo por amplificación por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Drosophila melanogaster* y los oligonucleótidos 1659 y 1660.

1.9. Radioisótopos

Los nucleótidos radiactivos [α -³²P]dCTP y [γ -³²P]dATP (Amersham) se utilizaron en el marcaje de sondas y de oligonucleótidos para retardos respectivamente.

1.10. Anticuerpos

- Anti-DREF. Utilizado en ensayos de retardo en gel según descrito previamente (Ruiz de Mena et al. 2000).
- Anti-mtTFB1. Obtenido en conejo. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:20 (Matsushima et al. 2005).
- Anti-mtTFB2. Obtenido en conejo. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:25 (Matsushima et al. 2004).
- Anti- β ATPasa. Obtenido en conejo. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:2000. Preparado en el laboratorio del Dr. R.Garesse.
- Anti-HRP (Jackson Immunoresearch). Obtenido en conejo. Utilizado para inmunohistoquímica como marcador de células del sistema nervioso de *Drosophila*, dilución 1:200.
- Anti-BrdU (Becton-Dickinson). Obtenido en ratón y acoplado al fluorocromo FITC. Utilizado para inmunohistoquímica, dilución 1:20.
- Anti-caspasa3 (Cell Signalling). Obtenido en conejo. Utilizado para inmunohistoquímica, dilución 1:50.
- Anti-wingless (Hybridoma Center). Obtenido en ratón. Utilizado para inmunohistoquímica, dilución 1:50).
- GAR (Nordic). Anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Obtenido en cabra. Utilizado como anticuerpo secundario en inmunotransferencias, dilución 1:5000.
- GAM (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Obtenido en cabra. Utilizado como anticuerpo secundario en inmunotransferencias, dilución 1:5000.
- Anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 467 (Molecular Probes). Utilizado como anticuerpo secundario para inmunohistoquímica, dilución 1:200.
- Anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo FITC (Jackson Immunoresearch). Utilizado como anticuerpo secundario para inmunohistoquímica, dilución 1:200.
- Anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo Rhodamine Red X (Jackson Immunoresearch). Utilizado como anticuerpo secundario para inmunohistoquímica, dilución 1:200.

2. MÉTODOS

Las técnicas básicas de biología molecular tales como clonaje de fragmentos de ADN, técnicas electroforéticas aplicadas al análisis de ácidos nucleicos y proteínas, cultivos bacterianos, etc., se realizaron según describen Sambrook y colaboradores (Sambrook and Russell 2001) o de acuerdo con los protocolos especificados en las citas correspondientes.

2.1. Clonajes

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima PLATINUM Pfx DNA polymerase (Invitrogen) cuando los fragmentos de ADN a clonar tenían un tamaño superior a 1 kb. En el resto de los casos se utilizaron enzimas Taq DNA polymerase (Eppendorf, Finnzymes o Biotools).

Las enzimas de restricción necesarias para los clonajes se emplearon siguiendo las recomendaciones indicadas por las casas comerciales (Invitrogen, Roche, New England Biolabs). Para las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se utilizaron indistintamente la enzima T4 DNA ligase (Promega) o el kit Quick Ligation (New England Biolabs).

Para romper extremos 5' protuberantes de fragmentos de ADN se empleó la enzima DNA polymerase I Large-Klenow- fragment (Promega). En el caso de extremos 5' recesivos, éstos se romaron con la enzima T4 DNA polymerase (Roche).

Para determinar el tamaño de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS se emplearon marcadores de peso molecular preteñidos (Invitrogen). Para estimar el tamaño de fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa se utilizaron los marcadores 1kb- o 100pb- DNA ladder (Invitrogen).

2.2. Obtención de ácidos nucleicos

2.2.1. Obtención de ARN de *D.melanogaster*

El ARN total fue obtenido siguiendo las instrucciones del kit TRIzol Reagent (Invitrogen) a partir de larvas en diferentes tiempos de desarrollo. Todo el material y las soluciones utilizadas para trabajar con ARN se trataron con 0.1% DEPC. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la disolución a una longitud de onda de 260nm.

2.2.2. Obtención de ADN

2.2.2.1. Obtención de ADN plasmídico de *E.coli*

Para la obtención de pequeñas cantidades de ADN de plásmidos se partió de 3ml de cultivo líquido y el ADN se extrajo utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Para obtener ADN plasmídico a gran escala se partió de 250ml de cultivo líquido y la extracción de ADN se realizó con el kit QIAGEN Plasmid Maxi (QIAGEN).

2.2.2.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN).

2.2.2.3. Obtención de ADN genómico de *D.melanogaster*

El ADN genómico fue obtenido a partir de larvas de tiempo de desarrollo conocido. Se homogenizaron 10 larvas en 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 60mM NaCl y 0.5% SDS. Tras eliminar los restos celulares por centrifugación (10000xg 5min), la solución fue fenolizada y tratada con 10µg/ml de enzima RNase A

durante 15 min a 37°C. La solución se fenolizó de nuevo, el ADN se precipitó con 2 volúmenes EtOH, NaAc 0.3M y se lavó con 80% EtOH. El ADN se resuspendió en H₂O y se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la disolución a una longitud de onda de 260nm.

2.3. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de los distintos clones de ADN se realizó utilizando el método de secuenciación automática en geles desnaturalizantes de acrilamida/bis en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM, Madrid).

El análisis de secuencias, la generación de mapas de restricción, el procesamiento de los resultados de secuenciación y el alineamiento de secuencias se realizaron con los programas BioEdit Sequence Alignment Editor versión 5.0.9 (Hall 1999) y Vector NTI versión 9.0.0 (InforMax).

Las comparaciones de secuencias con las bases de datos del NCBI y FlyBase se realizaron con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El análisis de las regiones promotoras de los distintos genes se realizó utilizando la base de datos TRANSFAC 7.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) y los programas Regulatory Sequence Analysis Tools (<http://www.flychip.org.uk/rsa-tools/>) y MatInspector (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html>).

2.4. Obtención de proteínas

2.4.1. Preparación de extractos nucleares de células Schneider S2 y de embriones

Los extractos nucleares de células Schneider S2 se prepararon siguiendo protocolos descritos anteriormente (Dignam et al. 1983; Preston et al. 1988) con ligeras modificaciones. Se partió de 10-20x10⁶ células que se recogieron por centrifugación (400xg 10min) y se resuspendieron en tampón A (10mM Hepes pH7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 200mM DTT, 1mM PMSF). Después de 10min de incubación a 4°C, las células fueron sedimentadas por centrifugación (400xg 10min 4°C), resuspendidas en el tampón A con 0.5% NP-40 e incubadas 10min a 4°C. Los núcleos fueron recogidos por centrifugación (400xg 10min 4°C) y resuspendidos en el tampón B (20mM Hepes pH7.9, 25% glicerol, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 200mM EDTA, 200mM DTT, 1mM PMSF). Después de incubar 30min a 4°C, las membranas nucleares fueron eliminadas por centrifugación (10000xg 20min 4°C).

Para obtener extractos nucleares embrionarios de *D.melanogaster*, embriones de menos de 16 horas se decorionizaron con NaClO durante 3min y se homogenizaron en buffer A (15mM Hepes pH7.9, 10mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.35M sacarosa, 0.5mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 200mM PMSF). Tras centrifugar 10min a 500xg en frío, resuspender y volver a centrifugar 10min a 2000xg en frío, los núcleos se resuspendieron en buffer B (20mM Hepes pH7.9, 25% glicerol, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.2mM DTT, 200mM PMSF), se incubaron a 4°C durante 20min y tras centrifugar 20min a 13000xg y 4°C se obtuvieron los extractos nucleares.

La concentración final de proteínas en los extractos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.4.2. Preparación de extractos de proteína total de larvas

El extracto total de proteínas se obtuvo directamente homogenizando larvas de 3^{er} estadio en tampón Laemmli (62.5mM Tris-HCl pH6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol) en una proporción 1larva/20μl tampón. Los homogenados se centrifugaron dos veces a máxima velocidad y temperatura

ambiente para eliminar los restos celulares. La concentración final de proteínas en los extractos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.4.3. Preparación de proteínas mitocondriales de larvas

2.4.3.1. Proteínas mitocondriales para inmunodetección

El extracto de proteínas mitocondriales se obtuvo a partir de mitocondrias que se aislaron por centrifugación diferencial. Larvas de 3^{er} estadio se homogenizaron mecánicamente con 4 pases de émbolo utilizando homogenizadores de vidrio-teflón y el tampón 20mM Tris-HCl pH8, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 0.5mM EDTA, 0,25M sacarosa, 1mM DTT, 1mM PMSF en una proporción 1larva/20µl tampón. Los homogenados se centrifugaron a 800xg 10min 4°C y se recogió el sobrenadante. Las mitocondrias se sedimentaron con una segunda centrifugación a 7500xg 10min 4°C se lavaron y se resuspendieron pipeteando en tampón de homogenización. La concentración final de proteínas mitocondriales en los extractos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.4.3.2. Proteínas mitocondriales para medir la actividad de la cadena respiratoria

Aproximadamente 50 mg de larvas de 3^{er} estadio se homogenizaron mecánicamente con 5 pases de émbolo en 800µl de tampón SETH (250mM sacarosa, 2mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH7.4, 100U/L heparina) utilizando homogenizadores vidrio-teflón. El homogenado se centrifugó a 800xg 10min 4°C y el sobrenadante de esta primera centrifugación se centrifugó una segunda vez a 7500xg 10min 4°C. El pellet obtenido, que corresponde a la fracción mitocondrial, se lavó y se resuspendió en 200µl de tampón SETH pipeteando suavemente. Las mitocondrias se sonicaron durante 6seg. La concentración final de proteínas mitocondriales en los extractos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.4.3.3. Obtención de mitocondrias para medir la capacidad de síntesis de ATP

Se partió de 10-20 larvas de 3^{er} estadio que se homogenizaron como se indica en el apartado anterior en 500µl de tampón 0.22M sacarosa, 0.12M manitol, 40mM tricina pH7.5, 1mM EDTA (Toivonen et al. 2001). Finalmente, las mitocondrias se resuspendieron en 50µl del buffer de homogenización. Las medidas de síntesis de ATP se realizaron usando extractos mitocondriales frescos.

2.5. Determinación del sitio de inicio de transcripción

El sitio de inicio de transcripción de los distintos genes se determinó con el kit First Choice RLM-RACE (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método está basado en las técnicas clásicas RACE descritas anteriormente (Maruyama and Sugano 1994; Schaefer 1995). Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos internos y específicos que se describen en el apartado correspondiente. Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pGEMT-Easy y se secuenciaron al menos diez clones de cada uno de los genes.

2.6. Cultivo de células Schneider S2

Las células se crecieron a 25°C en medio Schneider *Drosophila* (Invitrogen), suplementado con 10% suero fetal bovino (Invitrogen) y en presencia de los antibióticos estreptomycin (100mg/ml) y penicilina (100 UI/ml). Estas células crecen en suspensión y para su mantenimiento se pasaron dos veces a la semana realizando diluciones 1/3-1/5.

2.7. Ensayos de transfección transitoria en células en cultivo

Las transfecciones se realizaron mediante el método de precipitación con fosfato cálcico según lo descrito previamente (Lefai et al. 2000). 24h antes de la transfección se sembraron 1×10^6 células por muestra en 3ml de medio de cultivo. Se cotransfectaron 2 μ g de las diferentes construcciones en el vector pXP2 junto con 1 μ g del plásmido pAc5.1/V-5-His/lacZ. Las células se lavaron 8 horas después de la transfección y se incubaron durante 48 horas.

Para preparar los extractos celulares, las células se recogieron por centrifugación (400xg 10min), se lavaron dos veces en PBS 1x, una vez en tampón fresco TEN (40mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 150mM NaCl) y se resuspendieron en 100 μ l del tampón de lisis (Lysis Reagent Luciferase Kit, Promega). Tras una incubación de 2min, los restos celulares fueron eliminados por centrifugación (13000rpm 2min).

La actividad promotora de los distintos fragmentos se determinó normalizando la actividad luciferasa con los valores de actividad β -galactosidasa, que se utilizó como control. La actividad luciferasa se midió según las instrucciones del kit Luciferase Assay System (Promega) y la actividad β -galactosidasa según protocolos previamente descritos (Sambrook and Russell 2001). Todas las transfecciones fueron realizadas al menos en tres experimentos independientes.

2.8. Ensayos de retardo en gel

Los oligonucleótidos se marcaron individualmente con 25 μ Ci [γ -32P]dATP (Amersham Pharmacia) utilizando la enzima T4 polinucleótido kinasa (Roche) durante 1h 37°C. El oligonucleótido marcado se purificó con las columnas Sephadex G-25 MicroSpin (Amersham). Para anillar los oligonucleótidos, éstos se mezclaron, se calentaron durante 5min a 95°C y se enfriaron lentamente.

Aproximadamente 50000cpm de la sonda marcada se incubaron durante 30min a 4°C con 5-10 μ g de proteínas nucleares en presencia del tampón de unión (20% glicerol, 1mM DTT, 20mM Hepes pH7.9, 5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 100mM KCl) y 1 μ g poli(dIdC). En los experimentos de competición se añadió a la mezcla de incubación un exceso de sonda fría (10-200 veces). En los experimentos de súper-retardo, a los 15 minutos de incubación se añadió 1 μ l del anticuerpo anti-DREF a la mezcla de incubación. Los complejos ADN-proteína formados se resolvieron en geles de poliacrilamida al 7% en TBE 0.5x. Los geles se secaron y posteriormente se autorradiografiaron.

2.9. Ensayos de localización subcelular

Para determinar la localización subcelular se diseñaron proteínas de fusión con GFP ya descritas en el apartado correspondiente. Estas proteínas se expresaron en células Schneider S2 mediante transfección transitoria según el método de fosfato cálcico mencionado anteriormente en este trabajo. Entre 24-48 horas después de la transfección, las células se incubaron con 50nM TMRE (Molecular Probes), un fluoróforo que se une específicamente a la membrana mitocondrial. Inmediatamente las células se visualizaron en un microscopio confocal láser Leica TCS SP2 (Leica) observándose las proteínas de fusión en verde y las mitocondrias que han unido TMRE en rojo.

2.10. Cultivo de *D.melanogaster*

Las líneas de *D.melanogaster* se crecieron en medio estándar de levadura, glucosa y agar a 25°C y 65% de humedad relativa en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. La observación de larvas y moscas se

realizó con una lupa MZFLIII (Leica) equipada con una lámpara de luz UV.

2.11. Generación de líneas transgénicas de *D.melanogaster*

Las líneas transgénicas se generaron a partir de embriones yw utilizando la técnica de transformación mediada por elementos P descrita inicialmente por Spradling y Rubin (Spradling and Rubin 1982) con ligeras modificaciones. Embriones de 45min AED se microinyectaron con una solución que contenía 0.6µg/µl de la construcción pPUAST:IR correspondiente y 0.2µg/µl del plásmido pUChsπΔ2-3, que codifica la transposasa necesaria para la inserción. Los embriones que llegaron a la etapa adulta se cruzaron con moscas yw y, de la descendencia, se seleccionaron las moscas transformantes por el color rojo de los ojos. Las moscas transformantes se cruzaron entre ellas con el fin de obtener líneas homocigóticas y, para determinar el cromosoma de inserción, se realizaron dos cruces sucesivos con la línea balanceadora w;CyO/If;TM6,Tb/MKRS.

2.12. Experimentos UAS-GAL4

Los transgenes *UAS-IR* se expresaron utilizando el sistema UAS-GAL4 diseñado originalmente por Brand y Perrimon (Brand and Perrimon 1993). Para dirigir la expresión del transgén se utilizó la línea daGAL4, que expresa el factor de transcripción GAL4 bajo control del promotor del gen *daughterless*. Machos homocigotos para la inserción UAS-IR se cruzaron con hembras vírgenes homocigotas daGAL4 y la descendencia de estos cruces fue sujeto de estudio y análisis. Los cruces, de 150-200 moscas aproximadamente en la mayoría de los casos, se pasaron diariamente durante tres semanas y se realizaron fotografías de los mismos cada 24 horas.

Estos cruces se realizaron también modificando las condiciones de temperatura e intercambiando el sexo de los animales, es decir, machos GAL4 se cruzaron con hembras UAS-IR.

2.13. Análisis de los niveles de ARNm por qRT-PCR

2µg de ARN total de cada muestra se retrotranscribieron utilizando oligo(dT) como cebador y el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Partiendo de diluciones de los ADNc obtenidos, se realizaron reacciones de PCR a tiempo real en presencia de SYBR Green I (Molecular Probes) en un termociclador Rotor Gene (Corbett Research) empleando el siguiente programa: 94°C 3'; 40 ciclos (94°C 20"/58°C 20"/72°C 20"/82°C 15"); 72°C 6'; 50°C 3'; rampa de desnaturalización. Para cada gen se utilizaron cebadores específicos, diseñados con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW.cgi>), que ya han sido descritos previamente en este trabajo. La mezcla de reacción contenía 1x SyBr Green I, 0.2mM dNTPs, 1x tampón del enzima, 4mM MgCl₂, 0.5U Taq polymerase (Biotools), 0.3µM de cada oligonucleótido y 4µl de una dilución 1/20 de los productos de retrotranscripción en un volumen final de 20µl. Los resultados proceden del análisis por triplicado de tres muestras independientes.

2.14. Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron con 25µCi [α-32P]dCTP utilizando el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para purificar las sondas y eliminar los nucleótidos radiactivos no incorporados se emplearon las columnas de Sephadex G-50 NICK (Amersham).

2.15. Hibridación de ADN unidos a membrana (Southern blot)

5µg de ADN de cada muestra se digirieron con la enzima XhoI (Invitrogen) y los fragmentos genómicos resultantes se resolvieron en geles de agarosa/TBE al 0.8%. Antes de transferirlos, los geles se lavaron con H₂O, se incubaron en 0.2N HCl 20min y se lavaron dos veces con 0.4N NaOH. A continuación y siguiendo protocolos básicos (Sambrook and Russell 2001), se transfirieron a membranas de nylon Zeta-Probe (Bio-Rad) y se fijaron a las mismas mediante cross-linking con luz UV. Las membranas se prehibridaron durante más de 2 horas a 65°C en tampón Z (170mM Na₂HPO₄, 79mM NaH₂PO₄, 7% SDS) y se hibridaron con la sonda correspondiente en las mismas condiciones durante más de 14 horas. Las membranas se lavaron dos veces en condiciones de alta astringencia (0.2x SSC, 0.1% SDS a 65°C 20min) y, finalmente, se analizaron con un aparato PhosphorImager (Amersham) y se autorradiografiaron.

2.16. Hibridación de ARN unidos a membrana (Northern blot)

5µg de ARN total de cada muestra se resolvieron en geles de agarosa/formaldehído al 1%. Siguiendo protocolos básicos (Sambrook and Russell 2001), la transferencia a membranas, la fijación a las mismas, la prehibridación, la hibridación de las sondas, los lavados y el análisis final se realizaron como se describe en el apartado anterior.

2.17. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western blot)

De acuerdo con protocolos de rutina (Sambrook and Russell 2001), 20µg de proteína mitocondrial de cada muestra se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Millipore). Las membranas se preincubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (1x PBS, 0.5% leche desnatada en polvo) y, a continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en las condiciones preestablecidas para cada uno de ellos. Las membranas se lavaron cuatro veces con 1x PBS, 0.1% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario pertinente durante 1 hora a temperatura ambiente. Como reactivo de revelado para visualizar las bandas de proteínas se utilizó el kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham).

2.18. Estudio de la viabilidad de líneas y cruces

Para cuantificar la viabilidad de las distintas líneas parentales y del cruce en el que se produce la interferencia de ARN del gen *d-mtTFB2*, se recogieron alrededor de 300 embriones de cada uno de los genotipos en placas de agar-mosto. Los embriones se incubaron a 25°C y se alimentaron con levadura seca humedecida en agua. Se anotó el número de animales que alcanzaron los siguientes estadios de desarrollo: larva III, pupa y adulto. Posteriormente se calcularon los porcentajes relativos de supervivencia de cada uno de ellos.

2.19. Medida de masa y tamaño de larvas de *D.melanogaster*

Para medir la masa, el día 7 AED, y también el día 14 en el caso de larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2*, se recogieron 50 larvas de 3^{er} estadio de cada uno de los genotipos crecidas en las mismas condiciones. Las larvas se lavaron, se secaron y se transfirieron a un tubo de plástico antes de pesarlas en una balanza de precisión (max.=410g, d=0.001g, Boeco). Los datos representan la media de las medidas de cuatro experimentos independientes.

Para medir el tamaño, el día 7 AED se recogieron 20 larvas de 3^{er} estadio de cada uno de los genotipos, se

lavar on, se colocaron en un portaobjetos y se les dió un choque térmico de 5min a 65°C para inmovilizarlas y, posteriormente, fotografiarlas. Las dimensiones de las larvas, longitud y diámetro, se determinaron utilizando el programa Adobe Photoshop versión 7.0 (Adobe).

2.20. Preparación y fotografía de mandíbulas y espiráculos de larvas de *D.melanogaster*

La morfología de mandíbulas y espiráculos anteriores se visualizó siete días AED en larvas de cada uno de los genotipos. La porción anterior de las larvas se colocó entre dos portaobjetos, los cuales se pegaron fuertemente entre sí. Las mandíbulas y los espiráculos se observaron y se fotografiaron, con objetivos 20x y 10x respectivamente, en un microscopio Eclipse E400 (Nikon) acoplado a una cámara digital Olympus DP50 (Olympus) utilizando los programas ViewFinder y Studio Lite.

2.21. Estudio de la función mitocondrial

2.21.1. Análisis de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria

Las medidas de actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria y del complejo citrato sintasa se realizaron en un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-1603 (Shimadzu Corp.), a partir de extractos de proteínas mitocondriales preparados como se ha indicado previamente en este trabajo. Se siguieron los protocolos establecidos por el grupo de trabajo del Dr. J.Arenas (Hospital 12 de Octubre, Madrid), los cuales están descritos en la siguiente referencia (Perez-Carreras et al. 2003). La temperatura de incubación para medir la actividad de los complejos fue de 30°C, excepto para el complejo IV que fue de 38°C. Las actividades enzimáticas se expresan en nanomoles de sustrato consumido o producido por minuto y por miligramo de proteína ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes.

2.21.2. Análisis de la capacidad mitocondrial de síntesis de ATP

La capacidad mitocondrial de síntesis de ATP se determinó con el kit ATP Bioluminiscent Assay (Sigma), basado en una técnica original de Wibom et al. (Wibom et al. 1991), utilizando un luminómetro Optocomp I BG-1 (GEM Biomedical Inc.). Los extractos mitocondriales se prepararon como se ha especificado más arriba en este trabajo. Las medidas se realizaron en presencia de los sustratos glutamato/malato a una concentración de 10mM cada uno y tampón de incubación (5mM MgCl_2 , 10mM KH_2PO_4 , 0.2% BSA, 0.1mM ADP, 54uM APP) según lo descrito anteriormente (Toivonen et al. 2001). Los datos proceden de dos experimentos independientes.

2.22. Estudio de la ruta glucolítica

2.22.1. Medida de la actividad del enzima fosfofructoquinasa

Los extractos proteicos en los que se midió la actividad fosfofructoquinasa (PFK) se prepararon según lo descrito previamente (Currie and Sullivan 1994) con algunas modificaciones. Aproximadamente 10 larvas de 3^{er} estadio se homogenizaron en 150 μl del tampón correspondiente (50mM fosfato sódico pH8.0, 1mM DTT, 1mM EDTA, 5mM MgCl_2). El homogenado se centrifugó a 13000rpm durante 10min a 4°C y el sobrenadante obtenido se recogió en frío para inmediatamente medir en él la actividad PFK. De acuerdo con lo establecido anteriormente (Gonzalez-Mateos et al. 1993), la mezcla de reacción contenía 50mM Hepes, 100mM KCl, 5mM MgCl_2 pH7.2, 0.15mM NADH, 1mM MgATP, 1mM F6P, 3mM G6P, 2U aldolasa, 2U triosafosfato isomerasa, 2U glicerol-3-P-deshidrogenasa, 5mM fosfato potásico, 1mM sulfato amónico, 0.1mM cAMP y 10 μl del extracto proteico en un volumen final de 1ml. La actividad del enzima se

monitorizó midiendo la disminución de absorbancia a una longitud de onda de 340nm en un espectrofotómetro (Shimadzu). La concentración total de proteína se determinó con el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.22.2. Medida de la concentración de los metabolitos intermediarios de la glucólisis

La cuantificación de los metabolitos glucolíticos y los nucleótidos trifosfato (ATP, ADP y AMP) se realizó según lo descrito con pequeñas variaciones en la preparación de las muestras (Gonzalez-Mateos et al. 1993). Alrededor de 0.5g de larvas de 3^{er} estadio congeladas se homogenizaron en 1ml de ácido perclórico al 8% y etanol al 40% a 4°C y los extractos citosólicos se obtuvieron según lo indicado en el protocolo mencionado. Los metabolitos se midieron en un espectrofotómetro UV-visible UV-1603 (Shimadzu Corp.).

2.23. Efectos del suministro oral de ecdisona

Los experimentos de suministro oral de ecdisona se llevaron a cabo de forma similar a lo descrito anteriormente (Freeman et al. 1999). Se realizaron puestas de cada uno de los genotipos en placas de agar-mosto y se recogieron larvas de 2° estadio 48 horas AED. Las larvas se transfirieron a tubos de plástico que contenían 3ml de agar y una punta de espátula de levadura seca que se humedeció con 20-hidroxiecdisona (1mg/ml 20-HE (Sigma), 10% EtOH) o 10% EtOH. Los tubos se incubaron a 25°C y se contó el número de animales que entraban en pupación o que llegaban al estadio adulto.

2.24. Detección de actividad β -galactosidasa en el sistema muscular larvario por tinción con X-Gal

Con el fin de visualizar el sistema muscular de larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2*, se generaron líneas transgénicas que contenían el transgén *UAS-lacZ* además del transgén *UAS-IR*, ambos en homocigosis en los cromosomas II y III respectivamente. Estas moscas se cruzaron con la línea *daGAL4* y en larvas de 3^{er} estadio de la descendencia se procedió a tefir el sistema muscular completo con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiránósido). La detección de actividad β -galactosidasa se realizó siguiendo protocolos clásicos con ligeras modificaciones descritas anteriormente (Marco-Ferreres et al. 2005). El tiempo de incubación necesario para desarrollar el color fue de 10min. Las muestras se montaron en Vectashield (Vector Laboratories), se observaron en un microscopio Eclipse E400 (Nikon) y se fotografiaron con una cámara digital Olympus DP50 (Olympus) utilizando los programas ViewFinder y Studio Lite.

2.25. Inmunocitoquímica

2.25.1. Visualización del sistema nervioso y de las uniones neuromusculares

Las larvas de 3^{er} estadio se diseccionaron, se fijaron en 4% paraformaldehído durante 30min y se lavaron cuatro veces en solución de lavado (1x PBS, 0.4% Triton X-100) durante 15min. Para tefir las neuronas y visualizar el sistema nervioso, las preparaciones fijadas se incubaron en solución de bloqueo (1x PBS, 5% suero de cabra, 2% BSA, 0.4% Triton X-100) durante 30min. A continuación se incubaron con el anticuerpo anti-HRP durante 16 horas a 4°C, se lavaron cuatro veces durante 15min y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 568 durante 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron cuatro veces durante 15min y se montaron en Vectashield (Vector Laboratories). El sistema nervioso central y las uniones neuromusculares se visualizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica) con los objetivos de inmersión en aceite de 63x y 100x.

2.25.2. Visualización del patrón de expresión del gen *wingless* y de células apoptóticas en discos imaginales de ala

El patrón de expresión del gen *wingless* (*wg*) se visualizó en discos imaginales de ala de las líneas UAS-IR-B2, de la línea daGAL4 y de las líneas interferidas para el gen *d-mtTFB2*. En discos imaginales de ala de larvas con el genotipo *w;UASgfp,apGAL4/+;UAS-IR-B2/+* se tiñeron, además de las células que expresaban el gen *wg*, las células apoptóticas con el anticuerpo anti-caspasa3.

Los discos imaginales de larvas de 3^{er} estadio se diseccionaron en 1x PBS a 4°C y se fijaron con 1x PBS, 4% paraformaldehído durante 20min a temperatura ambiente. A continuación se bloquearon con 1x PBS, 1% BSA, 0.3% Triton X-100 durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 16 horas a 4°C. Tras cuatro lavados de 15min en solución de bloqueo, se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron y se montaron en Vectashield (Vector Laboratories). Las preparaciones se visualizaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica). Para medir las áreas y el número de células en apoptosis se utilizó el programa analySIS FIVE (Olympus Digital Imaging Solutions).

2.25.3. Visualización de la proliferación celular en el sistema nervioso central por tinción con BrdU

La incorporación de BrdU se realizó según lo descrito por Truman y Bate con alguna variación (Truman and Bate 1988). La porción anterior de larvas de 3^{er} estadio se cultivó en medio Schneider (Invitrogen) en presencia de 100µg/ml BrdU (Sigma) durante 30min a temperatura ambiente y, a continuación, se fijó en 1x PBS, 5% formaldehído durante 15min. Tras un tratamiento de desnaturalización del ADN en 2.2N HCl, las muestras se neutralizaron con 100mM Borax. La incorporación de BrdU se monitorizó por incubación con un anticuerpo anti-BrdU conjugado al fluorocromo FITC. Los cerebros se diseccionaron del resto del tejido y se montaron en Vectashield (Vector Laboratories) con 1.5µg/ml DAPI. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica) utilizando los objetivos de inmersión en aceite 10x y 63x. Las áreas de los cerebros se midieron con el programa LCS Simulator (Leica Microsystems).

2.26. Citometría de flujo

Los discos imaginales de ala y los cerebros de larvas de 3^{er} estadio se diseccionaron en 1x PBS. Para disgregar las células de estos tejidos se siguió el protocolo descrito por Neufeld et al. (Neufeld et al. 1998). Aproximadamente se partió de 20 discos imaginales de ala y 10 cerebros de cada genotipo. La suspensión de células se analizó en un citómetro de flujo FACS Vantage SE (Becton Dickinson) y el procesamiento de los resultados se realizó con los programas FACS Diva y Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

2.27. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con los programas Excel (Microsoft) y GraphPad Prism versión 4.03 para Windows (GraphPad Software). En la mayoría de los casos se utilizó el test ANOVA de una variable y el post-test de Bonferroni para determinar la significación estadística de las diferencias obtenidas en los resultados de las distintas muestras.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE GENES ESENCIALES PARA LA REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DEL GENOMA MITOCONDRIAL

1.1. Antecedentes sobre la identificación y el clonaje de los genes analizados

Durante la realización de esta tesis doctoral se han desarrollado distintas estrategias experimentales para caracterizar funcionalmente y/o estudiar la regulación de la expresión de varios factores que forman parte de las maquinarias de replicación y transcripción del ADNmt en *Drosophila melanogaster*. Los genes de este organismo que codifican los factores de transcripción mitocondriales tipo B (d-mtTFB1 y d-mtTFB2), una helicasa mitocondrial (d-mthelicasa) y el factor mitocondrial de terminación de la transcripción (DmTTF) han sido identificados y clonados en los últimos años por grupos de investigación cuyo trabajo está directamente relacionado con el estudio de la función mitocondrial en *Drosophila* y con quienes hemos mantenido una estrecha colaboración. La localización genómica y la estructura de los genes que codifican estas cuatro proteínas se encuentra resumida en la Tabla 1.

Las proteínas d-mtTFB1 (CG7319) y d-mtTFB2 (CG3910) fueron identificadas en el laboratorio de la Dra. L.Kaguni en Michigan State University (East Lansing, EE.UU.) mediante el rastreo de la base de datos Berkeley *Drosophila* Genome Project (<http://www.fruitfly.org/>). Como punto de partida se tomó el producto génico CG7319 que había sido sugerido anteriormente como potencial candidato en *D.melanogaster* para ser el ortólogo a h-mtTFB, el único factor mitocondrial tipo B que se había descrito en humanos hasta entonces (McCulloch et al. 2002). El alineamiento de ambos factores con sus respectivos ortólogos en humano y ratón mostraba una conservación de la secuencia en torno al 30-40% en ambos casos (Matsushima et al. 2004; Matsushima et al. 2005).

La proteína d-mthelicasa (CG5924) también se clonó en el laboratorio de la Dra. L.Kaguni a partir del análisis del alineamiento de la proteína primasa/helicasa gp4 del bacteriófago T7 con varios ortólogos eucariotas (Spelbrink et al. 2001).

A diferencia de las anteriores, la proteína DmTTF se clonó en el laboratorio del Dr. P.Cantatore en la Universidad de Bari (Italia) utilizando una estrategia bioinformática y molecular (Roberti et al. 2003). Esta proteína presenta homología estructural y de secuencia con h-mTERF y mtDBP, sus ortólogos en humanos y en erizo de mar respectivamente, y por tanto funcionaría en *D.melanogaster* como un factor de terminación de la transcripción mitocondrial. Los experimentos de transporte y procesamiento que realizaron en mitocondrias aisladas demostraron la localización mitocondrial de DmTTF, de acuerdo con las predicciones de los programas informáticos de localización subcelular.

GEN	Cromosoma	Tamaño (pb)	Exones	Intrones	ADNc (pb)	5'UTR (pb)	3'UTR (pb)
<i>d-mtTFB1</i>	3 L	1642	2	1	993	506	80
<i>d-mtTFB2</i>	3 R	1690	4	3	1359	93	63
<i>d-mthelicasa</i>	2 L	2165	3	2	1842	-	96
<i>DmTTF</i>	2 L	1587	3	2	1230	112	126

Tabla 1. Información extraída de la base de datos FlyBase sobre los genes estudiados en este trabajo. La función de todos ellos está relacionada con el metabolismo del ADNmt en *D.melanogaster*.

1.2. Localización subcelular

Como primera aproximación al estudio de la función de estos genes, nos propusimos determinar la localización subcelular de las proteínas que codifican. Todas ellas deberían tener un destino mitocondrial puesto que allí es donde teóricamente ejercerían su función.

En primer lugar realizamos un análisis *in silico* utilizando los programas MitoProtII 1.0 (Claros and Vincens 1996) y TargetP 1.0 (Emanuelsson et al. 2000), los cuales predicen la localización subcelular de la proteína de interés y, en caso de ser posible, el punto de procesamiento del péptido señal. Los programas informáticos predijeron claramente un destino mitocondrial para las proteínas d-mtTFB1 y d-mthelicasa mientras que al factor d-mtTFB2 sólo le asignaron una probabilidad de localización mitocondrial del 50%.

PROTEÍNA	Tamaño (aa)	TargetP (%)	MitoProtII (%)
d-mtTFB1	330	85	78
d-mtTFB2	452	43	47
d-mthelicasa	613	70	74

Tabla 2. Análisis *in silico* del destino subcelular. Los resultados representan la probabilidad, expresada como porcentaje, de destino mitocondrial calculada por cada programa informático para las distintas proteínas.

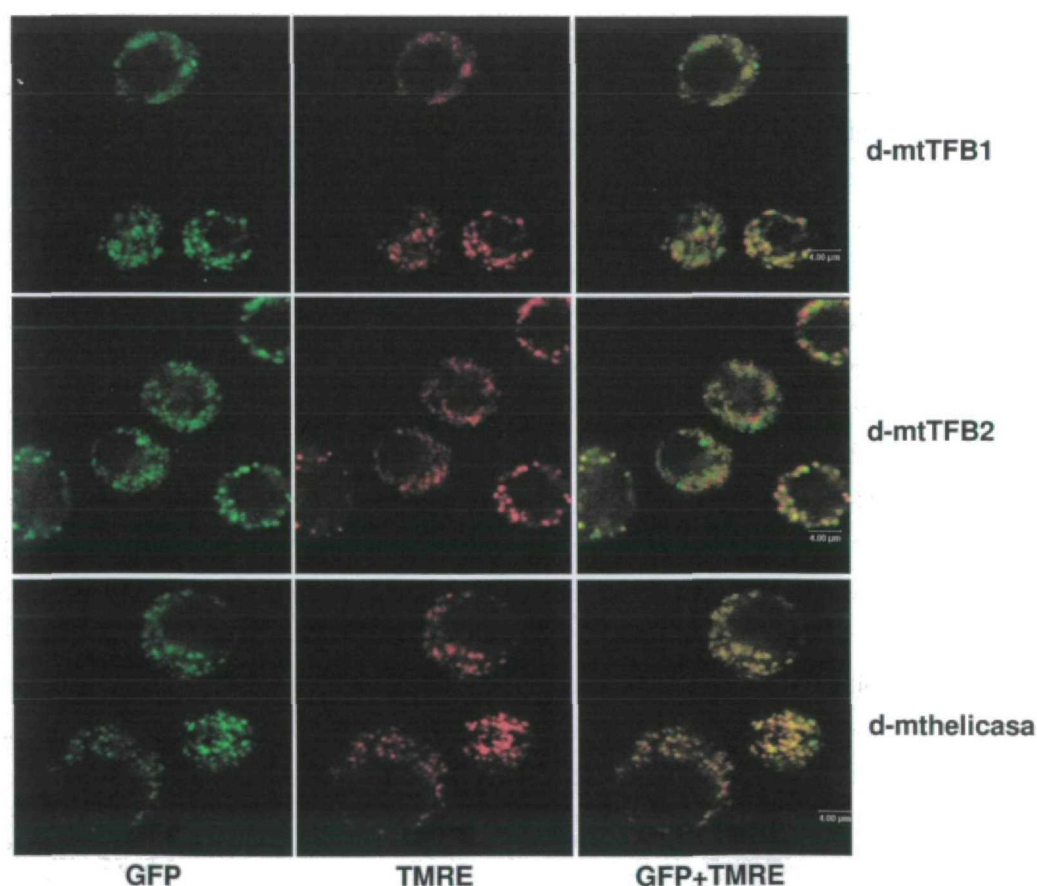


Figura 7. Localización mitocondrial de las proteínas quiméricas generadas por la fusión en fase de la región amino terminal o de la proteína de interés completa con la proteína verde fluorescente (GFP) mediante ensayos de transfección transitoria en células Schneider S2. Las imágenes de microscopía confocal muestran en la primera columna en verde la localización de las proteínas de fusión, en la segunda columna en rojo la localización de las mitocondrias que han incorporado el fluoróforo TMRE y en la tercera columna la superposición de las columnas anteriores. El color amarillo se produce por la colocalización del verde y del rojo y demuestra la localización mitocondrial de las tres proteínas estudiadas.

Dado que la localización mitocondrial de DmTTF estaba ya demostrada, para confirmar el destino mitocondrial de las tres proteínas restantes generamos proteínas quiméricas que contenían la región amino terminal de cada una de ellas fusionada en fase con la proteína verde fluorescente (GFP). Las proteínas de fusión resultantes tendrían el destino subcelular indicado por el péptido señal o presecuencia de la proteína de interés y, al ser excitadas con luz de la longitud de onda adecuada, emitirían luz verde. De esta forma sería posible visualizar la posición física de la proteína de interés dentro de la célula. Al no predecir con claridad los programas informáticos el tamaño del péptido señal, decidimos clonar un tercio de cada proteína comenzando desde el extremo Nt. En el caso de la *d-mthelicasa* realizamos una segunda construcción que contenía la proteína completa ya que, utilizando sólo el primer tercio, no pudimos determinar con precisión su localización en la célula, probablemente porque ésta se deba a secuencias internas que no están contenidas en el primer tercio de la misma. Las construcciones así obtenidas se clonaron en vectores de expresión bajo control del promotor del gen de la actina 5C y se transfectaron transitoriamente en células Schneider S2 para obtener la expresión de las proteínas quiméricas. Las mitocondrias se visualizaron utilizando TMRE, un fluoróforo que se une específicamente a la membrana mitocondrial de células vivas y produce luz roja si se excita adecuadamente.

Como demuestran las imágenes de microscopía confocal de la figura 7, las tres proteínas presentaban una localización mitocondrial ya que el color verde producido por las proteínas de fusión colocalizaba con el color rojo que indicaba la posición de las mitocondrias en la célula.

1.3. Determinación del sitio de inicio de transcripción

Antes de caracterizar la región promotora de los cuatro genes, quisimos confirmar que los sitios de inicio de transcripción que aparecían en la base de datos del NCBI eran correctos y comprobar si eran únicos para cada gen o, por el contrario, se trataba de genes con sitios de inicio de transcripción heterogéneos.

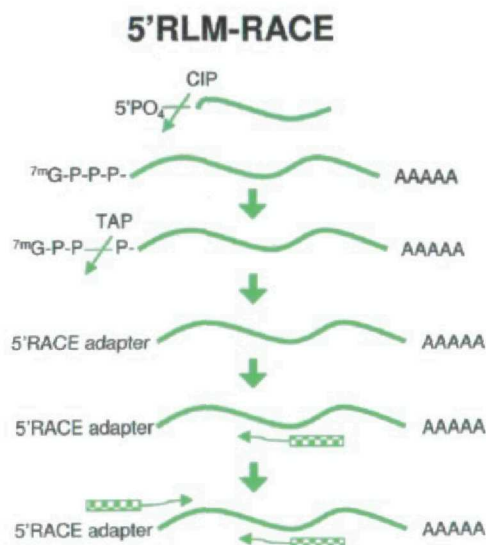


Figura 8. Esquema del protocolo RACE utilizado para identificar los sitios de inicio de transcripción.

La determinación del sitio de inicio de transcripción de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2* y *d-mthelicasa* se realizó utilizando el kit comercial RLM-RACE (RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA Ends) siguiendo el esquema de la figura 8. Este método garantiza la identificación de extremos 5' de moléculas de

ARN portadoras de caperuza, es decir, de ARN mensajeros (ARNm). Partimos de ARN total extraído de moscas adultas y obtuvimos productos de ADNc elongados a partir del adaptador suministrado en el kit, el cual previamente había sido ligado a los extremos 5' de todos los ARNm presentes. A continuación se realizaron dos PCR consecutivas utilizando los oligonucleótidos especificados para cada gen en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-Easy para su posterior secuenciación.

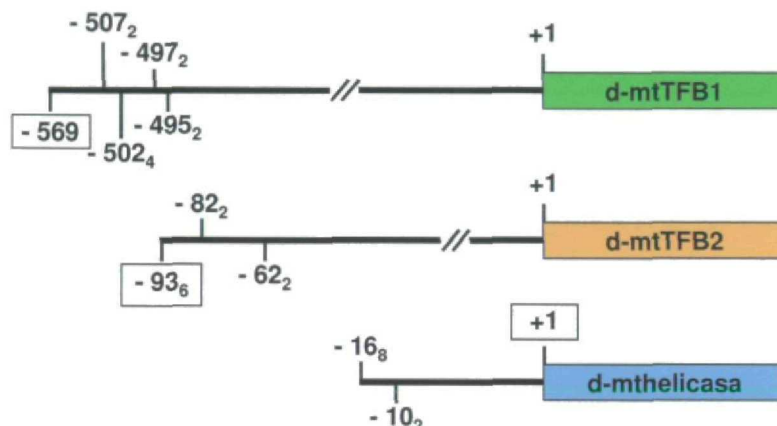


Figura 9. Determinación del sitio de inicio de transcripción. Los sitios de inicio de transcripción para cada gen se numeraron respecto al ATG iniciador de la secuencia codificante considerado como +1. Los subíndices representan la frecuencia obtenida para cada sitio de un total de diez clones secuenciados. La posición enmarcada en un recuadro es el sitio teórico de inicio de transcripción para cada gen según la base de datos NCBI.

Como se muestra en la figura 9, en el caso del gen *d-mtTFB1* la base de datos del NCBI situaba el inicio teórico de transcripción en posición -569, considerando +1 la posición del codón ATG que codifica la metionina iniciadora. La secuenciación de diez clones reveló la existencia de cuatro sitios de inicio de transcripción diferentes, todos ellos comprendidos entre las posiciones -507 y -495. Por tanto, en lugar del sitio teórico, para estudios posteriores consideramos como válido el sitio de inicio en posición -507. Para el gen *d-mtTFB2* obtuvimos tres sitios de inicio de transcripción diferentes comprendidos entre las posiciones -93 y -62. En este caso el sitio de inicio en posición -93 es coincidente con el teórico, por lo que podemos concluir que posiblemente sea el más frecuente aunque no el único. Según la base de datos el sitio de inicio de transcripción del gen *d-mthelicasa* mapea sobre el ATG iniciador. Los resultados obtenidos de la secuenciación de los diez clones demostraron que existía un sitio de inicio de transcripción en posición -16 y otro en posición -10. En este caso el sitio de inicio en posición -16 es el que ha sido considerado como válido para estudios posteriores por ser el más frecuente.

En conclusión, los tres genes muestran un inicio de transcripción heterogéneo siendo *d-mtTFB2* el que presenta mayor variabilidad, ya que sus posibles sitios de inicio de transcripción distan entre sí 30 nucleótidos.

1.4. Caracterización de las regiones promotoras

1.4.1. Análisis *in silico* de las regiones promotoras

Una vez definidos los sitios de inicio de transcripción a los que asignamos la posición +1, procedimos a analizar *in silico* las regiones 5' comprendidas entre las posiciones -2000 y +1 de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF*. Este trabajo experimental forma parte de una línea de investigación más

amplia, iniciada por nuestro grupo hace unos años y cuyo objetivo consiste en la caracterización sistemática de las regiones promotoras de genes implicados en biogénesis mitocondrial.

En primer lugar, analizamos las secuencias próximas a los sitios de inicio de transcripción de cada uno de estos genes con la intención de identificar los elementos presentes en sus respectivos promotores basales. Los resultados del análisis (Tabla 3) revelaron la ausencia de cajas TATA en todos ellos. Sin embargo, estos promotores sí contenían otros elementos consenso denominados Inr (Initiator) y DPE (Downstream Promoter Element). En *Drosophila*, el elemento Inr consiste en una secuencia definida como 5'-TCA(G/T)T(T/C)-3' y suele estar situado inmediatamente delante o sobre el sitio de inicio de transcripción (Arkhipova 1995). Por el contrario, el elemento DPE aparece en la región 3' cadena abajo del inicio de transcripción y presenta una secuencia definida como 5'-(A/G)G(A/T)CGTG-3' (Burke and Kadonaga 1996).

GEN	Posición Inr	Secuencia Inr	Posición DPE	Secuencia DPE
<i>d-mtTFB1</i>	-7	TCAGcT	+65	GGcCGTt
<i>d-mtTFB2</i>	-15	aCAGTT	+145	GGAacTG
<i>d-mthelicasa</i>	-11	TCAcTT	+68	caACGTG

Tabla 3. Resultados del análisis *in silico* de los promotores basales. En minúsculas se representan las posiciones de los elementos que se desvían de la secuencia consenso establecida.

Utilizando los programas informáticos MatInspector y RSA-tools y la base de datos TRANSFAC, buscamos motivos de ADN ya descritos anteriormente que potencialmente pudieran participar en la regulación de la expresión de estos genes. Los factores de transcripción que identificamos como candidatos eran factores miogénicos -como myf-5 y mef-2-, factores de desarrollo -como dorsal, caudal o hunchback-, factores de ciclo celular -como E2F-, DRE, etc. De entre todos los candidatos, el que nos pareció más relevante fue DRE. Este elemento, que es reconocido por el factor de transcripción DREF y cuya implicación en la expresión de genes relacionados con replicación del ADNn y proliferación celular había sido descrita previamente en *Drosophila* (Hirose et al. 1993), estaba presente en todos ellos. Como se mencionaba en el apartado correspondiente de la Introducción, trabajos previos de nuestro grupo ya habían demostrado que la expresión de algunos genes implicados en la replicación del ADNmt, como *d-mtSSB* (Ruiz de Mena et al. 2000) y *d-poly-β* (Lefai et al. 2000), estaba regulada por el sistema DRE/DREF. Por tanto, resultaba bastante coherente que los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF*, cuya función parecía claramente relacionada con el metabolismo del ADNmt, estuvieran también regulados por el mismo sistema.

Asimismo, procedimos a determinar si los distintos elementos DRE que localizamos en las regiones promotoras de estos genes de *D.melanogaster* estaban conservados, en cuanto a posición y secuencia, en las respectivas regiones promotoras de *D.pseudoobscura*, ya que normalmente los elementos funcionales suelen estar conservados entre distintas especies dentro de un mismo género. En la figura 10 se muestra esquemáticamente la conservación de los elementos DRE en las regiones promotoras analizadas pertenecientes a ambas especies. Aunque existían otros sitios DRE en los promotores estudiados, sólo se determinó la conservación de aquéllos que en *D.melanogaster* parecieron relevantes para la capacidad promotora de los mismos en experimentos preliminares de transfección transitoria en células en cultivo. En cada caso, analizamos la posición de los elementos DRE respecto al codón ATG iniciador y su grado de conservación con la secuencia consenso establecida.

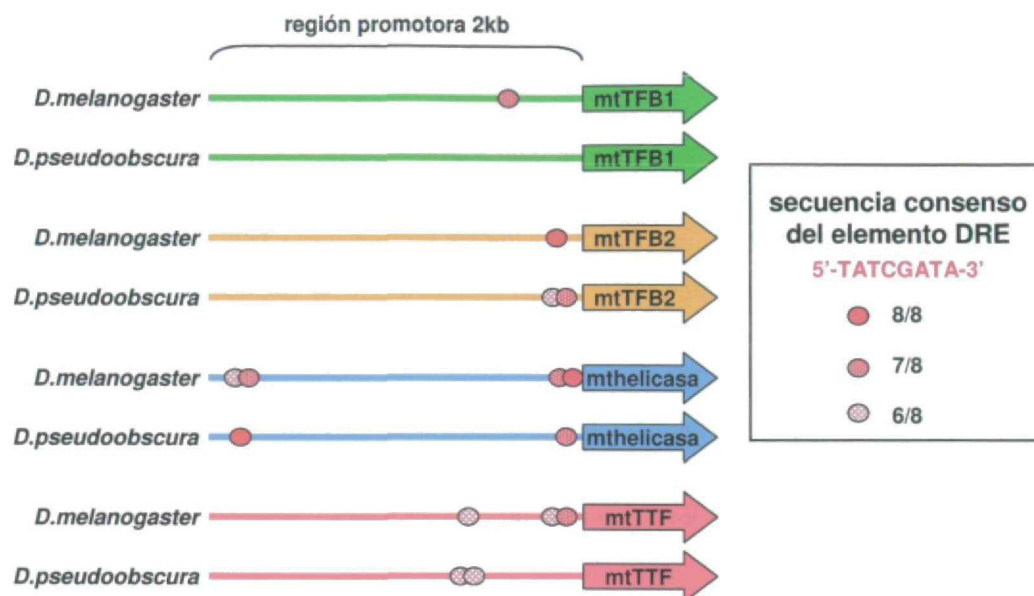


Figura 10. Alineamiento de las regiones promotoras de los genes indicados pertenecientes a dos especies distintas del género *Drosophilidae* para estudiar la conservación, en cuanto a posición y secuencia, de los elementos DRE identificados como potencialmente relevantes para la capacidad promotora de las mismas. Como muestra la leyenda, la presencia de elementos DRE en las regiones promotoras se representa mediante círculos de distintos colores según el grado de conservación de cada uno de ellos respecto a la secuencia consenso establecida. A excepción de los elementos DRE proximales del promotor del gen *DmTTF* y del elemento DRE localizado en el promotor del gen *d-mtTFB1*, el resto de los elementos DRE estudiados sí están conservados en las regiones promotoras de ambas especies.

1.4.2. Análisis funcional de las regiones promotoras en células en cultivo

Para analizar funcionalmente las regiones promotoras de los genes estudiados en este trabajo clonamos la región promotora de 2 kb de cada uno de ellos seguida de la región 5'UTR y, a continuación, realizamos delecciones seriadas de las mismas desde el extremo 5'. Las regiones promotoras de tamaños variables se subclonaron en el vector pxp2 que contiene el gen testigo de la luciferasa precedido de un sitio múltiple de clonaje. La actividad promotora de cada una de ellas se determinó midiendo los niveles de actividad luciferasa de las distintas construcciones en ensayos de transfección transitoria en células Schneider S2. En cada caso, a la región promotora de 2 kb completa se le asignó una actividad del 100% y la actividad del resto de construcciones se calculó como porcentaje frente a la construcción de mayor tamaño.

1.4.2.1. Región promotora del gen *d-mtTFB1*

Para estudiar la región promotora del gen *d-mtTFB1* preparamos una serie de delecciones teniendo en cuenta la presencia en posición -216 de un sitio DRE (7/8), es decir, que presenta siete nucleótidos conservados de los ocho que constituyen la secuencia consenso de este elemento. Como se observa en la figura 11, la actividad promotora disminuía progresivamente a medida que iba disminuyendo el tamaño de la región clonada, de tal manera que los 113 pb proximales sólo poseían el 20% de actividad con respecto al promotor de 1 kb, que era similar a la del promotor de 2 kb. Estos datos sugerían que debían existir varios elementos importantes para la expresión del gen localizados en la región promotora proximal de 1 kb. Sin embargo, apenas se observaban diferencias entre las construcciones p325 y p113, de donde podíamos deducir que el elemento DRE en posición -216 no era relevante para la expresión de este gen. Además, este sitio DRE no estaba conservado en el genoma de *D.pseudoobscura*, lo cual corroboraba nuestro resultado.

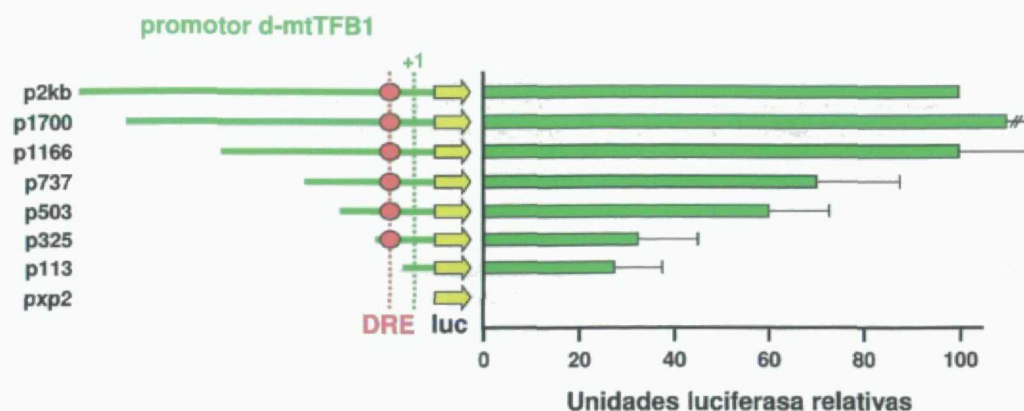


Figura 11. Análisis de la región promotora del gen *d-mtTFB1*. Realizando deleciones seriadas de la región promotora de 2 kb desde el extremo 5' se obtuvieron fragmentos que se clonaron delante del gen testigo de la luciferasa en el vector pxp2 para analizar su actividad promotora. En la parte izquierda de la figura se muestra una representación esquemática de los fragmentos del promotor analizados. Los elementos DRE estudiados se representan con un círculo de color rojo. Los nombres asignados a cada construcción indican los tamaños de las regiones promotoras contenidas con respecto al sitio de inicio de transcripción considerado como +1. Las actividades promotoras relativas de las distintas construcciones se determinaron mediante ensayos de transfección transitoria en células Schneider S2 y se indican en la parte de la derecha de la figura. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se normalizaron con los valores de actividad β -galactosidasa y la actividad promotora de cada fragmento se calculó en relación a la construcción de 2 kb a la que se le asignó arbitrariamente el 100% de actividad. Los valores representan la media aritmética \pm la desviación estándar de seis experimentos independientes.

Otro dato que nos pareció destacable era el tamaño inusualmente grande de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1*, con 500 pb aproximadamente. El análisis de esta secuencia reveló la existencia de una pauta de lectura abierta de 261 nucleótidos que estaba conservada en *D.pseudoobscura*, en *D.virilis* y en *Anopheles gambiae*. Este hecho podría sugerir, bien un papel funcional para este polipéptido, o bien una posible implicación del mismo en la modulación traduccional de d-mtTFB1. Ambas situaciones han sido descritas ya en organismos eucariotas. Así, recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado que los genes *gatC* y *poly- β* están codificados por un mismo ARNm en *Drosophilidae* y *A.gambiae*. Por otro lado, está bien documentado en la literatura el papel que desempeñan pequeñas pautas de lectura abierta, denominadas "upstream ORFs" (uORFs), en la modulación traduccional de genes que están codificados a continuación de las mismas, dentro del mismo ARNm (Morris and Geballe 2000).

Así, consideramos interesante estudiar la influencia de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1* sobre el promotor endógeno de 2 kb así como los efectos de su orientación. Como se observa en la figura 12, la región 5'UTR potenciaba claramente la actividad del promotor endógeno y dicho efecto era dependiente de su orientación. Para estudiar si el efecto de esta región era extensible a otros promotores realizamos una serie de construcciones quiméricas con las regiones promotoras de 1 kb de los genes *d-ATPasa- α* y *d-ATPasa- β* . Los resultados obtenidos demostraron que el efecto potenciador de la región 5'UTR era mucho menor en el caso del promotor quimérico construido con el promotor del gen *d-ATPasa- α* y ni siquiera se observaba en el caso del que contenía el promotor del gen *d-ATPasa- β* . Por lo tanto, podíamos concluir que el efecto de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1* no era extensible a otros promotores y que posiblemente dependa del contexto genómico en el que se encuentre.

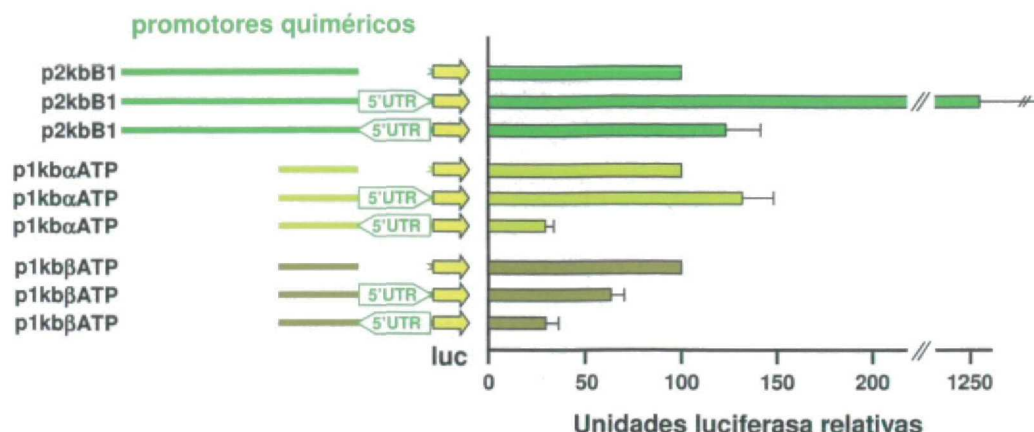


Figura 12. Efectos de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1* sobre la actividad promotora. Se prepararon construcciones que contenían las regiones promotoras que se indican clonadas en ausencia o en presencia de la región 5'UTR del gen *d-mtTFB1*, tanto en sentido directo como en sentido inverso. Las transfecciones y la valoración de la actividad promotora de las distintas construcciones se realizaron de un modo similar a lo descrito en la figura anterior. Los datos proceden de tres experimentos independientes.

1.4.2.2. Región promotora del gen *d-mtTFB2*

En el caso del promotor del gen *d-mtTFB2* existía un único sitio DRE (8/8) en posición -40. Realizamos una serie de deleciones hasta la posición -150 que resultaron mantener prácticamente el 100% de la actividad de la región promotora de 2 kb (Figura 13). La deleción del fragmento promotor comprendido entre las posiciones -150 y -50 reducía la capacidad promotora un 60%, lo cual sugería que en esta región podrían encontrarse elementos importantes para la expresión del gen *d-mtTFB2* distintos de DRE. Por otra parte, el hecho de que la construcción p50 conservara alrededor del 40% de la actividad del promotor de 2 kb, indicaba que el sitio DRE en posición -40 podía ser funcional. Sabíamos que en *D.pseudoobscura* existían dos elementos DRE (6/8) y (7/8) en las posiciones -50 y -40 respectivamente, por lo que decidimos mutagenizar el sitio DRE presente en la construcción p50 para determinar si era o no relevante. Los resultados obtenidos demostraban que este sitio DRE sí era funcional y que, por tanto, DREF podría estar implicado en la regulación de la expresión de este gen.

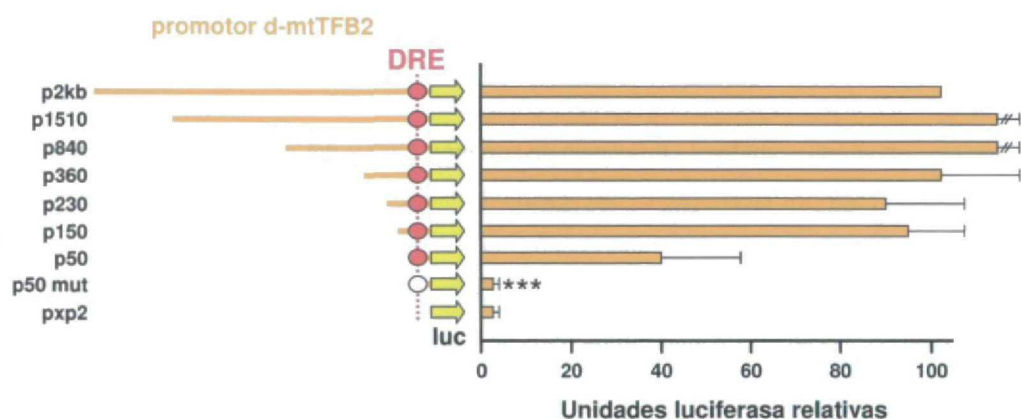


Figura 13. Análisis de la región promotora del gen *d-mtTFB2*. Realizando deleciones seriadas de la región promotora de 2 kb desde el extremo 5' se obtuvieron fragmentos que se clonaron delante del gen testigo de la luciferasa en el vector pxp2 para analizar su actividad promotora. En la parte izquierda de la figura se muestra una representación esquemática de los fragmentos del promotor analizados. Los elementos DRE estudiados se representan con un círculo rojo y la versión mutagenizada de los mismos con un círculo blanco. Los nombres asignados a cada construcción indican los tamaños de las regiones promotoras contenidas con respecto al sitio de inicio de transcripción considerado como +1. Las actividades promotoras relativas de las distintas construcciones se determinaron mediante ensayos de transfección transitoria en células Schneider S2

y se indican en la parte de la derecha de la figura. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se normalizaron con los valores de actividad β -galactosidasa y la actividad promotora de cada fragmento se calculó en relación a la construcción de 2 kb a la que se le asignó arbitrariamente el 100% de actividad. Los valores representan la media aritmética \pm la desviación estándar de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student (***) indica $P < 0,001$).

1.4.2.3. Región promotora del gen *d-mthelicasa*

El promotor del gen *d-mthelicasa* contiene dos sitios DRE dobles: un par solapantes y localizados sobre el inicio de transcripción, a los que nos referiremos como sitios DRE proximales; y otro par situado en posición -1840, a los que nos referiremos como sitios DRE distales. Los sitios DRE proximales cumplen 7/8 y 8/8 respectivamente respecto a la secuencia DRE consenso y uno de ellos está conservado en *D.pseudoobscura*. Los sitios DRE distales, por su parte, cumplen con el consenso en 6/8 y 7/8 posiciones respectivamente y en *D.pseudoobscura* existe un sitio DRE (8/8) único conservado en una posición prácticamente similar.

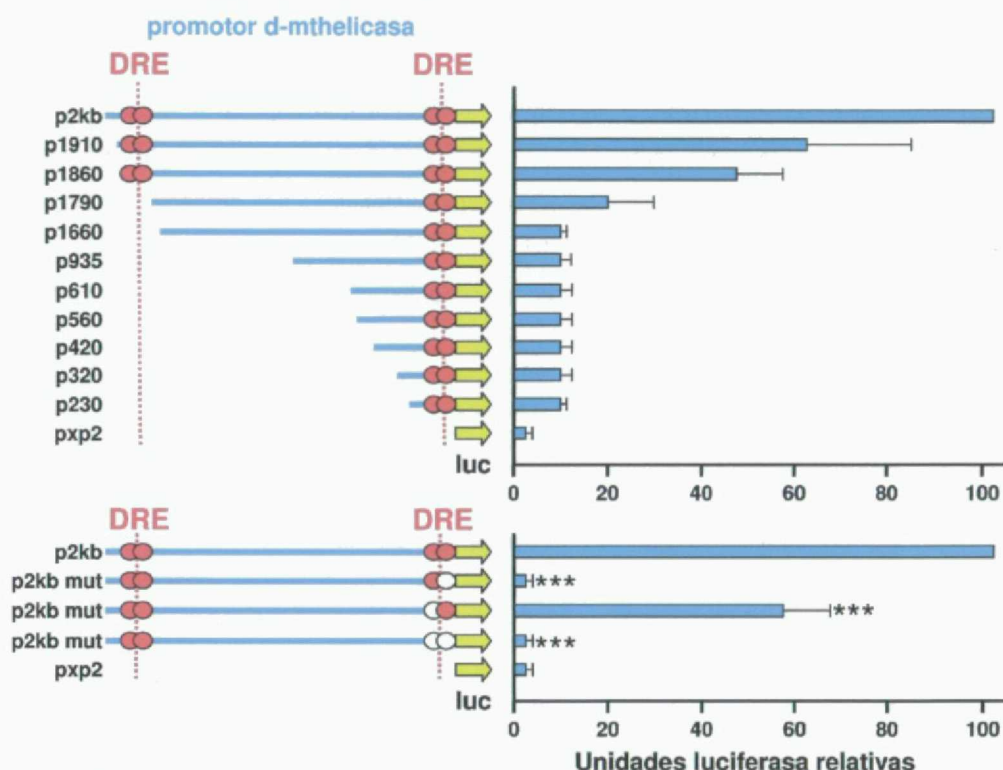


Figura 14. Análisis de la región promotora del gen *d-mthelicasa*. Realizando delecciones seriadas de la región promotora de 2 kb desde el extremo 5' se obtuvieron fragmentos que se clonaron delante del gen testigo de la luciferasa en el vector pxp2 para analizar su actividad promotora. En la parte izquierda de la figura se muestra una representación esquemática de los fragmentos del promotor analizados. Los elementos DRE estudiados se representan con un círculo rojo y la versión mutagenizada de los mismos con un círculo blanco. Los nombres asignados a cada construcción indican los tamaños de las regiones promotoras contenidas con respecto al sitio de inicio de transcripción considerado como +1. Las actividades promotoras relativas de las distintas construcciones se determinaron mediante ensayos de transfección transitoria en células Schneider S2 y se indican en la parte de la derecha de la figura. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se normalizaron con los valores de actividad β -galactosidasa y la actividad promotora de cada fragmento se calculó en relación a la construcción de 2 kb a la que se le asignó arbitrariamente el 100% de actividad. Los valores representan la media aritmética \pm la desviación estándar de seis experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (***) indica $P < 0,001$).

Antes de estudiar el papel de estos sitios DRE realizamos delecciones seriadas con el objetivo de acotar la región que fuera importante para la expresión de este gen (Figura 14). Los resultados que obtuvimos

demostraban que la región comprendida entre las posiciones -2000 y -1600 era determinante para la actividad promotora. A continuación realizamos nuevas delecciones en esta región teniendo en cuenta la posición de los sitios DRE distales. Como se observa en la figura 14, la construcción p1860 que contenía los sitios DRE distales presentaban una actividad promotora del 40-50% mientras que la construcción p1790, que ya no los contenía, tenía la mitad de actividad que la anterior, es decir, un 20%. Por tanto, aun sin descartar la presencia en esta región de otros elementos importantes para la expresión del gen *d-mthelicasa*, los resultados sugerían que, al menos en células Schneider S2, los sitios DRE distales participaban en la regulación de la expresión del mismo.

Por otra parte pensamos que los sitios DRE proximales debían ser relevantes por su ubicación y por su conservación en *D.pseudoobscura*. Decidimos mutagenizarlos juntos o por separado sobre la construcción del promotor de 2 kb completa. Como cabía esperar, ambos resultaron ser funcionales siendo mayor la relevancia del localizado justo sobre el inicio de transcripción.

El caso del promotor del gen *d-mthelicasa* resulta excepcional por varios motivos. Primero, porque el factor DREF parece funcionar como un elemento de la maquinaria basal de transcripción al unirse a los sitios DRE proximales, como había descrito previamente el grupo de R.Tjian (Hochheimer et al. 2002). Segundo, porque por primera vez se han observado sitios DRE potencialmente funcionales a una distancia tan grande del sitio de inicio de transcripción como lo están los sitios DRE distales. Y tercero, porque las dos funciones descritas para DREF como elemento basal de la maquinaria de transcripción y como factor de transcripción clásico se reúnen en un mismo promotor.

1.4.2.4. Región promotora del gen *DmTTF*

En el caso del gen *DmTTF*, el análisis *in silico* había revelado la presencia de un sitio DRE doble en posición -50 que cumplía con la secuencia consenso en 6/8 y 7/8 nucleótidos respectivamente. Además existía otro sitio DRE (6/8) en posición -360 que, a diferencia de los anteriores, sí estaba conservado en *D.pseudoobscura*.

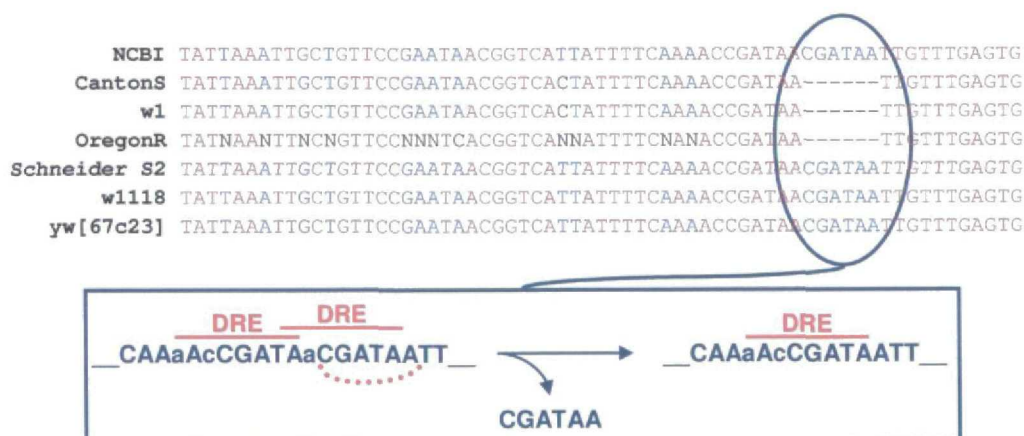
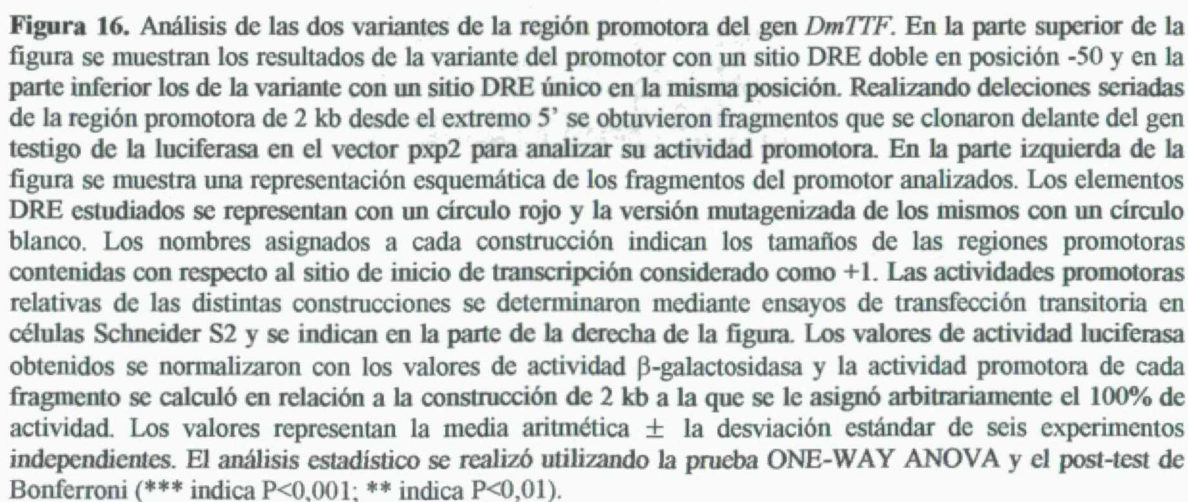


Figura 15. Polimorfismo hallado en la región promotora del gen *DmTTF*. Se secuenciaron las regiones promotoras correspondientes al gen *DmTTF* a partir de ADN genómico extraído de células Schneider S2 y de las cepas y líneas de *D.melanogaster* que se indican a la izquierda de la figura y se compararon con la secuencia depositada en la base de datos del NCBI. El alineamiento de las secuencias reflejaba la existencia de un polimorfismo que afectaba a los elementos DRE presentes en el promotor y que consistía en una delección de seis nucleótidos.



47

parte, la construcción p400 conservaba alrededor del 85% de la actividad del promotor de 2 kb. Como refleja la actividad de esta construcción y de sus variantes mutagenizadas, el sitio DRE en posición -360 también resultó ser funcional aunque en este caso su efecto era menos relevante y no era sinérgico con los dos situados en posición -50. Al contrario que el caso anterior, la región promotora que sólo presentaba un sitio DRE único en posición -50 no parecía estar regulada por DREF. Ni las deleciones ni la mutagénesis de los elementos DRE en posición -360 y/o -50 afectaron a la actividad de esta variante del promotor del gen *DmTTF*.

1.4.3. Caracterización funcional del elemento DRE en los promotores analizados

Para confirmar la funcionalidad de los sitios DRE que, *a priori*, habían parecido relevantes en los experimentos de mutagénesis y transfección transitoria en células en cultivo, se determinó si el factor DREF los reconocía y se unía específicamente a ellos.

Para ello realizamos ensayos de retardo en gel utilizando extractos de proteínas nucleares de embriones de *D.melanogaster* y de células Schneider S2. Como sondas empleamos parejas de oligonucleótidos que contenían los sitios DRE candidatos y que se especifican en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos se marcaron radiactivamente en sus extremos 5', se anillaron y se incubaron con los extractos proteicos en presencia y ausencia de competidor frío. Para demostrar la especificidad de la interacción de los complejos ADN-proteína y que efectivamente era DREF la proteína que intervenía, realizamos ensayos de súper-retardo en los que incubamos dichos complejos con un anticuerpo anti-DREF.

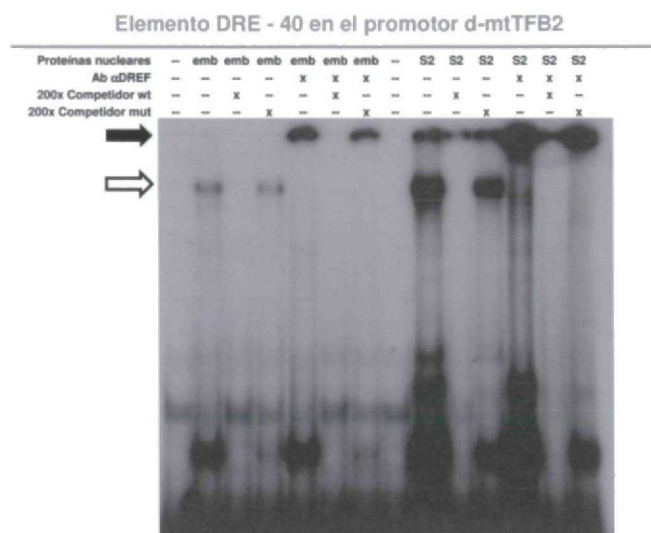


Figura 17. Ensayo de retardo en gel para demostrar la funcionalidad del elemento DRE en posición -40 en el promotor del gen *d-mtTFB2*. Para evaluar la unión del factor DREF al sitio DRE, los extractos de proteínas nucleares obtenidos a partir de embriones y de células Schneider S2 se incubaron con la sonda radiactiva correspondiente, en ausencia o en presencia de competidor frío salvaje o mutado. Las bandas de retardo se representan con una flecha hueca. Las incubaciones se realizaron también en presencia del anticuerpo anti-DREF para comprobar que efectivamente era DREF el que formaba parte de los complejos ADN-proteína. Las bandas de súper-retardo se representan con una flecha sólida.

Como se observa en la figura 17, podíamos afirmar que el sitio DRE localizado en la posición -40 del promotor del gen *d-mtTFB2* unía DREF específicamente como demostraban las bandas de retardo, que representan los complejos ADN-proteína, y las bandas de súper-retardo, que representan los complejos ADN-proteína-anticuerpo, y el hecho de que ambas fueran desplazadas por un exceso de sonda fría salvaje pero no por un exceso de sonda fría mutagenizada.

En el caso del gen *d-mthelicasa*, DREF se une tanto los elementos DRE distales como a los proximales presentes en su promotor (Figura 18). En ambos casos se observaban bandas de retardo y de súper-retardo que confirmaban que era el factor DREF la proteína que estaba reconociendo y uniéndose a los elementos DRE analizados.

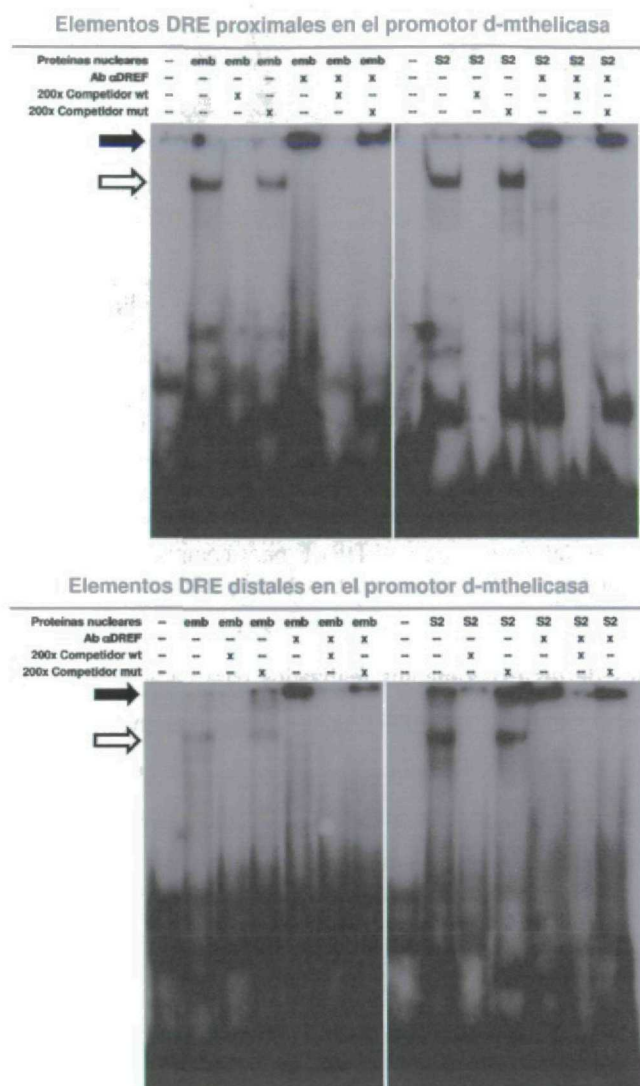


Figura 18. Ensayos de retardo en gel para demostrar la funcionalidad de los elementos DRE distales y proximales en el promotor del gen *d-mthelicasa*. Para evaluar la unión del factor DREF a los sitios DRE, los extractos de proteínas nucleares obtenidos a partir de embriones y de células Schneider S2 se incubaron con las sondas radiactivas correspondientes, en ausencia o en presencia de competidor frío salvaje o mutado. Las bandas de retardo se representan con una flecha hueca. Las incubaciones se realizaron también en presencia del anticuerpo anti-DREF para comprobar que efectivamente era DREF el que formaba parte de los complejos ADN-proteína. Las bandas de súper-retardo se representan con una flecha sólida.

Al igual que en los dos casos anteriores, los elementos DRE proximales del promotor del gen *DmTTF* también resultaron ser funcionales como se aprecia en la figura 19.

A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel, podíamos afirmar que todos los sitios DRE potencialmente relevantes en los promotores de los genes *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF* eran funcionales, ya que el factor DREF los reconocía y se unía a ellos específicamente. Esto lo demostraban las bandas de retardo y las bandas de súper-retardo que se observaban en todos ensayos realizados con los tres promotores.

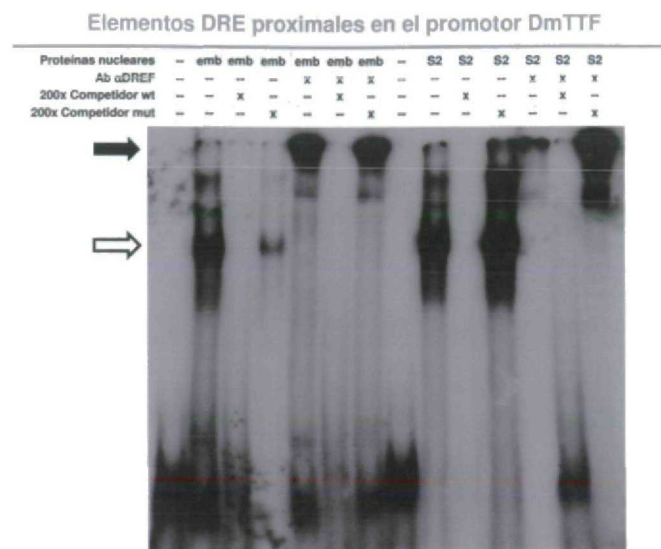


Figura 19. Ensayo de retardo en gel para demostrar la funcionalidad de los elementos DRE en posición -50 en la variante del promotor del gen *DmTTF* que contiene el sitio DRE doble. Para evaluar la unión del factor DREF a los sitios DRE, los extractos de proteínas nucleares obtenidos a partir de embriones y de células Schneider S2 se incubaron con la sonda radiactiva correspondiente, en ausencia o en presencia de competidor frío salvaje o mutado. Las bandas de retardo se representan con una flecha hueca. Las incubaciones se realizaron también en presencia del anticuerpo anti-DREF para comprobar que efectivamente era DREF el que formaba parte de los complejos ADN-proteína. Las bandas de súper-retardo se representan con una flecha sólida.

En conclusión, los resultados de los experimentos realizados para caracterizar las regiones promotoras de estos genes sugieren fuertemente que el sistema DRE/DREF está directamente implicado en la regulación de la expresión de los genes *d-mtTFB2* y *d-mthelicasa* pero no así en la expresión del gen *d-mtTFB1*. El promotor del gen *DmTTF* es singular, ya que los resultados obtenidos indican que pueden existir en la naturaleza dos versiones del mismo. Una de ellas es dependiente del sistema DRE/DREF, al menos en células Schneider, mientras que la otra no.

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES *d-mtTFB1* Y *d-mtTFB2* MEDIANTE INTERFERENCIA DE ARN EN *D.melanogaster*

2.1. Introducción

Los procesos de replicación y transcripción del ADNmt han sido estudiados en profundidad en los últimos años y, aunque recientemente se han identificado y clonado muchos de los factores que intervienen en ellos, no se descarta que existan otros aún desconocidos. Se han descrito los elementos que forman parte de las maquinarias basales de replicación y transcripción del genoma mitocondrial, lo cual ha permitido reproducir *in vitro* estos dos procesos. Sin embargo, todavía no se ha establecido definitivamente cuál es el mecanismo de replicación del ADNmt ni se conoce con exactitud cómo se regula el metabolismo del ADNmt.

Cuando se inició este trabajo acababan de identificarse los genes que codificaban los factores de transcripción mitocondriales tipo B en mamíferos. Estas proteínas presentaban cierta homología con las enzimas ARN-metiltransferasas bacterianas ya que contenían dominios tipo metiltransferasa dependientes de S-adenosilmetionina. La existencia de estos factores planteaba muchas preguntas acerca del metabolismo del ADNmt: ¿podían ambas proteínas funcionar como factores de transcripción?, ¿eran capaces de metilar ARN?, ¿era su función redundante?, ¿podía una compensar total o parcialmente la ausencia de la otra?, ¿qué papel tenía cada una en los procesos de replicación y transcripción del ADNmt?, ¿podían estar implicadas en traducción?. Intentar encontrar respuestas a estas cuestiones ha sido el objetivo de los grupos de investigación que hemos trabajado en este campo durante estos años.

En *Drosophila*, los genes que codifican los factores de transcripción mitocondriales tipo B habían sido identificados por el grupo de la Dra. L.Kaguni. Al comienzo de esta tesis, iniciamos un proyecto de colaboración que consistía en el estudio de la función de las proteínas *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* de *D.melanogaster* mediante la generación de “knock-downs” por interferencia de ARN (RNAi). En ese momento, la técnica de RNAi se había extendido enormemente y gozaba de una gran popularidad dentro de la comunidad científica porque había demostrado ser una herramienta muy útil para el estudio de la función de genes y proteínas. Además, en nuestro sistema modelo esta técnica había sido puesta a punto para ser utilizada tanto en células en cultivo como en el animal entero y resultaba muy adecuada pues todavía no se había desarrollado completamente la estrategia experimental para realizar “knock-outs” del gen de interés.

Como punto de partida, el grupo de la Dra. L.Kaguni preparó dos construcciones en las que había clonado repeticiones invertidas (IR) de un fragmento de ADNc de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* respectivamente. La idea original consistía en interferir cada gen individualmente usando el mismo tipo de construcción en células Schneider S2 y en el animal entero, para lo cual subclonaron las construcciones en los vectores de expresión adecuados. La interferencia de *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* en células en cultivo ya ha sido realizada (Matsushima et al. 2004; Matsushima et al. 2005) y en este trabajo se presentan los resultados de la interferencia en el animal entero.

2.2. Estrategia experimental de RNAi

2.2.1. Generación de líneas transgénicas

Para realizar el silenciamiento de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* partimos de las construcciones pPUAST:IR correspondientes y, siguiendo protocolos clásicos de microinyección de embriones de la línea yw, generamos líneas transgénicas que contuvieran insertado al azar en su genoma una copia de los vectores

pPUAST:IR-B1 y pPUAST:IR-B2 respectivamente. Estas líneas, a las que denominamos líneas UAS por contener las repeticiones invertidas bajo control de elementos UAS, se llevaron a homocigosis y se cruzaron con los stocks balanceadores para determinar el cromosoma de inserción según se indica en el apartado correspondiente de los Materiales y Métodos.

VECTOR	LÍNEAS TRANSGÉNICAS	INSERCIÓN EN CRII	INSERCIÓN EN CRIII
pPUAST:IR-B1	5	2	3
pPUAST:IR-B2	2	-	2

Tabla 4. Generación de líneas transgénicas para realizar el silenciamiento de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* en *D.melanogaster*. Mediante microinyección de embriones yw con los vectores indicados obtuvimos líneas transgénicas que contenían insertadas al azar en el genoma las repeticiones invertidas del gen correspondiente bajo control de elementos UAS. Se muestra el número de inserciones ocurridas en cada caso en los cromosomas II y III. No se produjo ninguna inserción en los cromosomas I y IV.

En el caso del gen *d-mtTFB1* se obtuvieron cinco líneas transgénicas independientes: dos con la inserción en el cromosoma II, denominadas UAS-B y UAS-E, y tres con la inserción en el cromosoma III, denominadas UAS-A, UAS-C y UAS-D. En el caso del gen *d-mtTFB2* se obtuvieron dos líneas transgénicas independientes con la inserción en el cromosoma III, denominadas UAS-1 y UAS-2. Todas las líneas eran viables en homocigosis y se mantuvieron como stocks sin balancear y balanceados como UAS-IR/UAS-IR: TM6B/MKRS las inserciones en el cromosoma II y como CyO/If:UAS-IR/UAS-IR las inserciones en el cromosoma III.

2.2.2. “Drivers” GAL4

Los “drivers” GAL4 son líneas transgénicas que expresan el factor de transcripción GAL4 bajo control de un promotor conocido y se utilizan para activar la transcripción de transgenes regulados por sitios UAS.

Nuestra idea inicial consistía en inducir la interferencia de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* de forma ubicua y temprana en el desarrollo. Decidimos utilizar un “driver” GAL4, denominado daGAL4, en el que la expresión del gen GAL4 está regulada por el promotor del gen *daughterless*, un factor de transcripción implicado en procesos de desarrollo. La línea daGAL4 es viable en homocigosis, contiene la inserción GAL4 en el cromosoma III y produce niveles de expresión altos y generalizados de los transgenes regulados por sitios UAS desde las primeras etapas del desarrollo de *Drosophila*.

En el caso de la interferencia del gen *d-mtTFB2*, decidimos con posterioridad emplear también “drivers” GAL4 específicos de tejido muscular, w;CyO/If;24B/24B, y de sistema nervioso, w;1407HM/1407HM;+/-.

2.2.3. Inducción de la interferencia de ARN

Para inducir la RNAi cruzamos hembras vírgenes daGAL4 con machos UAS-IR de forma que la interferencia de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* debía producirse en el 100% de la descendencia. En la mayoría de los casos los cruces se realizaron con 150 individuos en viales grandes y a 25°C, utilizando siempre el doble de hembras que de machos. Cuando no era necesario obtener una F1 numerosa, los cruces se realizaron en viales pequeños con 30 individuos manteniendo la proporción entre machos y hembras.

2.3. Fenotipo de la interferencia de los factores mitocondriales tipo B en *D.melanogaster*

2.3.1. RNAi del gen *d-mtTFB1*

La descendencia de los cruces de las cinco líneas UAS-IRB1 con la línea daGAL4 no presentaba aparentemente ningún fenotipo especial. Las moscas interferidas para el gen *d-mtTFB1* eran viables, fértiles y no sufrían ninguna alteración de comportamiento evidente. Los niveles de ARNm correspondientes al gen *d-mtTFB1*, analizados por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) en larvas, eran un 60-85% menores en las líneas RNAi-B1 que en las líneas UAS-IRB1 y daGAL4 que se utilizaron como controles (Figura 20). Los niveles de proteína disminuían en un rango similar (datos no mostrados). No se observaron variaciones significativas en los niveles de ARNm y proteína d-mtTFB2.

NIVELES DE mtTFB1 y mtTFB2 EN LARVAS RNAi-B1

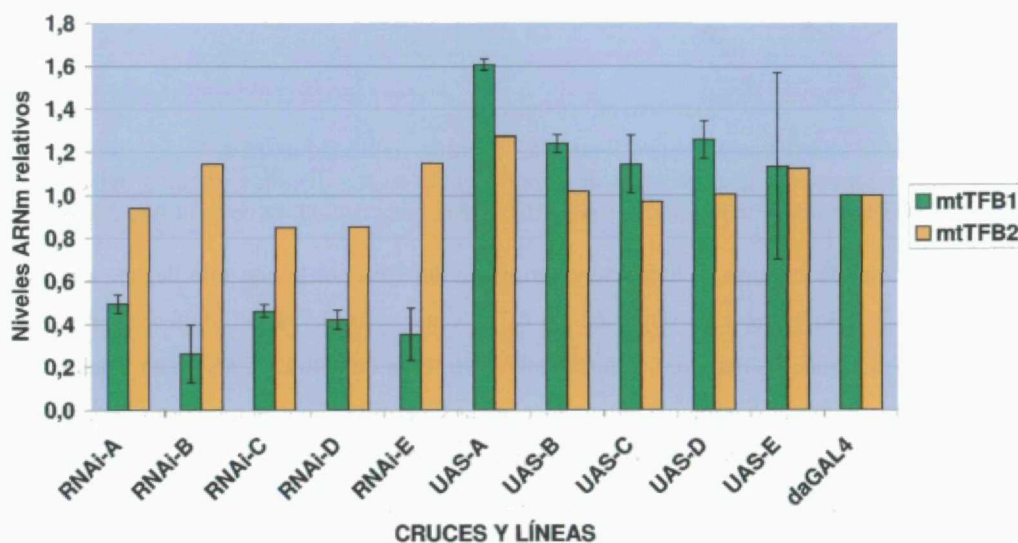


Figura 20. Niveles de expresión de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* medidos por qRT-PCR en larvas interferidas para el gen *d-mtTFB1*. Las líneas parentales UAS-IRB1 se utilizaron como controles y los niveles de ARNm se normalizaron frente a la línea daGAL4. En todas las líneas RNAi-B1 los niveles de ARNm d-mtTFB1 disminuyeron un 50-70% respecto a los controles. Los niveles de ARNm d-mtTFB2 no variaron sustancialmente.

Existen varias posibilidades para explicar la ausencia de fenotipo en las líneas RNAi-B1. Una de ellas es que la función de d-mtTFB1 no sea esencial o que pueda ser reemplazada por d-mtTFB2 u otra proteína. Otra, en nuestra opinión poco probable, es que el grado de interferencia alcanzado no sea suficiente y que la actividad de la proteína d-mtTFB1 restante sea capaz de compensar el déficit provocado por la RNAi.

2.3.2. RNAi del gen *d-mtTFB2*

El cruce de las dos líneas UAS-IRB2, UAS-1 y UAS-2, con la línea daGAL4 resultó ser letal en el estadio de larva. El 100% de la descendencia procedente de la línea UAS-2, cuyo genotipo denominamos RNAi-2, moría en larva de 3^{er} estadio mientras que en la descendencia del cruce con la línea UAS-1, cuyo genotipo denominamos RNAi-1, existía una mínima proporción de machos que alcanzaban la etapa adulta.

Para estudiar la viabilidad de las líneas interferidas, se recogieron aproximadamente 300 embriones de los cruces RNAi-B2 y de la línea parental daGAL4, que se utilizó como control, en puestas sucesivas cada 4 horas. A las 24 horas las larvas de 1^{er} estadio (L1) se pasaron a una placa nueva de agar-mosto con levadura y, tras 48 horas, las larvas de 3^{er} estadio (L3) se transfirieron a un vial con papilla donde se dejaron crecer.

Anotamos el número de individuos que alcanzaron los estadios L1, L3, pupa y adulto para elaborar una curva de supervivencia de cada genotipo (Figura 21).

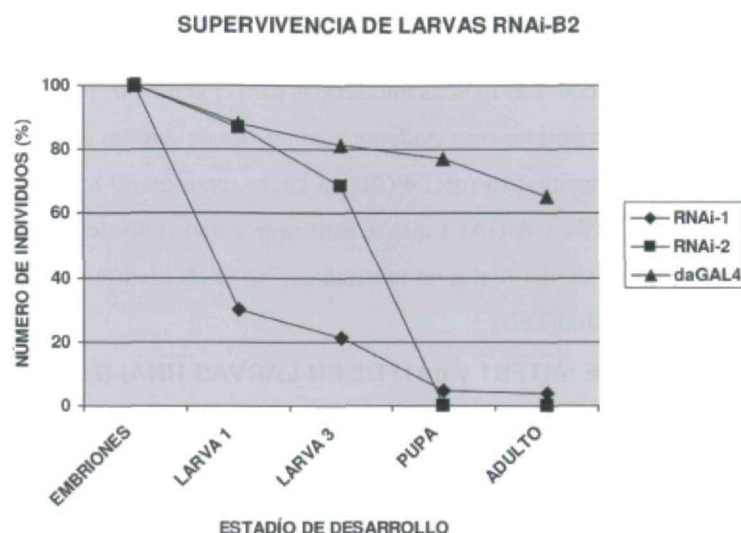


Figura 21. Efectos de la interferencia del gen *d-mtTFB2* sobre la viabilidad de *D.melanogaster* a lo largo del desarrollo. La gráfica representa el porcentaje de supervivencia en los distintos estadios del desarrollo de aproximadamente 300 embriones de los cruces RNAi-B2 y de la línea daGAL4 que se utilizó como control.

El cruce RNAi-1 presentaba una tasa de letalidad embrionaria del 70% por lo que sólo llegaba a L1 un 30%, un 21% alcanzaba L3, sólo entraba en pupación un 4,7% y nació un 3,7% de adultos, siempre machos. Invertimos el sentido del cruce, es decir, cruzamos hembras vírgenes de la línea UAS-1 con machos daGAL4 y observamos que no se formaba ninguna pupa, lo cual nos permitió considerar como “escapers” a los machos nacidos del cruce en sentido inverso y confirmar un 100% de letalidad para el cruce RNAi-1. A diferencia del anterior, el cruce RNAi-2 presentaba una tasa de letalidad embrionaria de tan sólo el 10%, al igual que la línea daGAL4. El 79% de las larvas L1 alcanzaba el estadio L3 pero ninguna entraba en pupación.

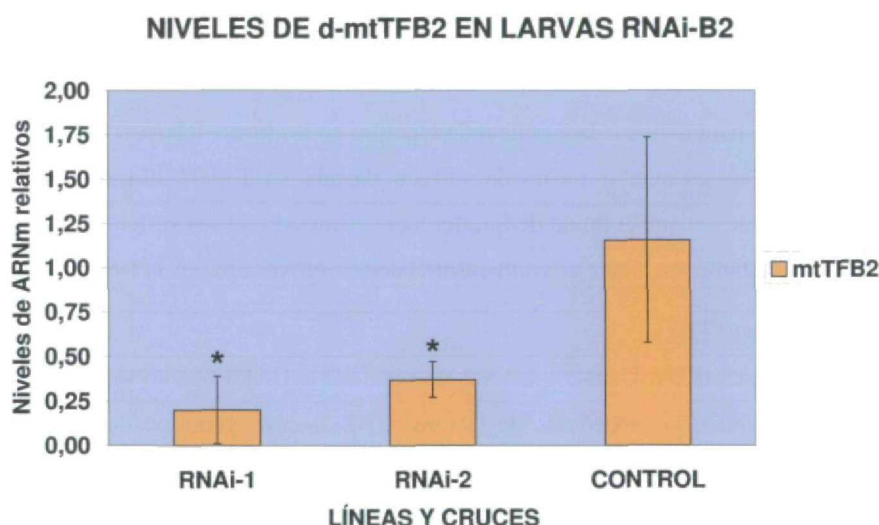


Figura 22. Niveles de expresión del gen *d-mtTFB2* en larvas RNAi-B2 medidos por qRT-PCR. Los niveles de ARNm se normalizaron y se relativizaron frente al valor de la línea daGAL4. Como controles adicionales se utilizaron las líneas UAS-IRB2. En las líneas interferidas, los niveles de ARNm *d-mtTFB2* disminuyeron más de un 60% respecto al control daGAL4. La significación estadística de tres experimentos independientes se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (* indica $P < 0,05$).

Para comprobar que la interferencia del gen *d-mtTFB2* estaba siendo efectiva y que era la responsable del fenotipo de parada en el desarrollo y letalidad de las larvas RNAi-B2, medimos los niveles de ARNm correspondientes a este gen por qRT-PCR en larvas L3 (Figura 22). Los niveles de ARNm se normalizaron y se expresaron en función de los niveles de la línea daGAL4. Como controles se utilizaron además las líneas parentales UAS-IRB2. Los resultados obtenidos mostraron una caída de los niveles de ARNm *d-mtTFB2* por debajo del 40% respecto al control daGAL4 en las dos líneas interferidas. Por tanto, la RNAi del gen *d-mtTFB2* estaba siendo efectiva y suficiente.

Al inducir la interferencia del gen *d-mtTFB2* exclusivamente en tejido muscular, el 100% de la descendencia de los cruces UAS-IRB2 con la línea *w;CyO/If;24B/24B* era viable y fértil. Por el contrario, la interferencia específica en sistema nervioso inducida por la línea *w;1407HM/1407HM;+/+* resultó ser letal en pupa. Aunque todavía no hemos determinado los niveles de interferencia alcanzados en cada uno de estos tejidos, los resultados preliminares parecen indicar que la función de *d-mtTFB2* en sistema nervioso es esencial para la vida del organismo mientras que la ausencia de su función en músculo, en un porcentaje todavía no establecido, es compatible con la vida.

En conclusión, la interferencia del gen *d-mtTFB2* en el organismo entero es letal en el 3^{er} estadio larvario en las dos líneas estudiadas. Las larvas interferidas que alcanzan el estadio L3 detienen su desarrollo y viven así hasta que finalmente mueren. La interferencia del mismo gen exclusivamente en músculo es viable mientras que la interferencia específica de sistema nervioso es letal en pupa.

Como la interferencia del gen *d-mtTFB1* no mostraba características fenotípicas aparentes y la interferencia del gen *d-mtTFB2* presentaba un fenotipo más concluyente, proseguimos nuestro trabajo centrándonos primero en el estudio de la función de *d-mtTFB2*.

2.4. Caracterización del fenotipo de las larvas RNAi-B2

Mediante la observación directa de la descendencia (F1) de los cruces RNAi-B2 sabíamos que las larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2* detenían su desarrollo en un estadio que parecía L3 a pesar de ser más pequeñas que las larvas L3 salvajes, que vivían en ese estadio un tiempo anormalmente largo de unos 25 días aproximadamente y que, aunque eran capaces de trepar por la pared del tubo en el que estaban contenidas ante la presencia de un foco de calor, en ningún momento abandonaban la papilla. Las larvas RNAi-B2 sufrían claramente una parada en su desarrollo y no un enlentecimiento del mismo.

2.4.1. Evolución y viabilidad de los cruces RNAi-B2

Para estudiar la evolución en el tiempo de la interferencia del gen *d-mtTFB2*, se realizaron cruces de 150 individuos entre las líneas UAS-IRB2 y la línea daGAL4 y se pasaron diariamente durante un mes. Como control se empleó la línea parental daGAL4. Para seguir la evolución de la F1, se seleccionaron dos viales de cada genotipo con una semana de diferencia y se fotografiaron cada día. Además, en estos viales se contabilizó el número de pupas formadas y de adultos eclosionados.

Las imágenes y la gráfica de la figura 23 constataban lo observado directamente. En el cruce RNAi-2 no se formaba ninguna pupa y en el cruce RNAi-1 se formaban muy pocas pupas, de las que nacían algunos machos “escapers”. Quedaba así confirmado que las larvas RNAi-B2 sufrían una parada en el desarrollo y que su viabilidad era nula. Pero lo más sorprendente de estas larvas era su supervivencia durante 25 días aproximadamente en el estadio larvario alcanzado. A partir del día 25 tras la puesta comenzaban a morir las

primeras larvas.

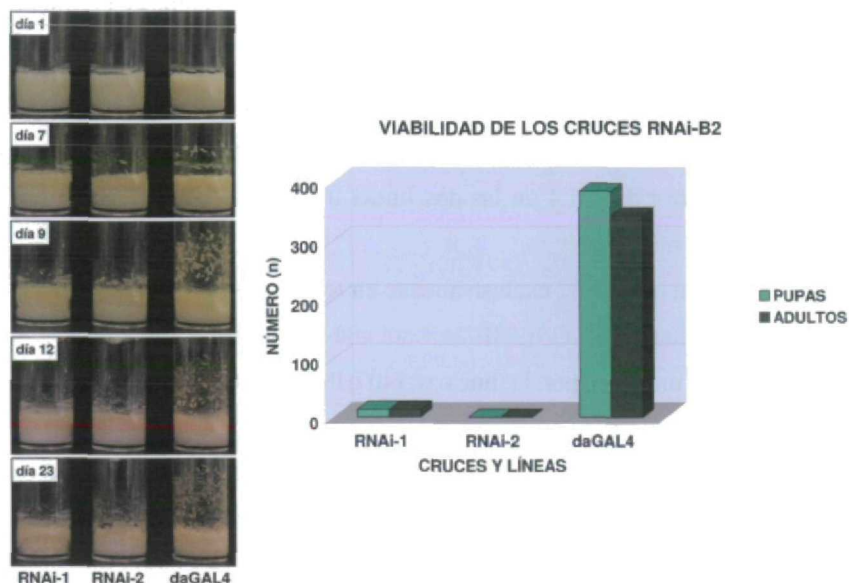


Figura 23. Evolución a lo largo del desarrollo de los cruces RNAi-B2. Se realizaron cruces de 150 individuos de los genotipos indicados. Como control se utilizó la línea parental daGAL4. Las fotografías muestran el estado del cruce en los días que se indican contados a partir del día de la puesta. La gráfica adjunta recoge el número de pupas y adultos que se formaron en dos viales diferentes de cada genotipo.

Con el objetivo de interferir más suavemente el gen *d-mtTFB2*, realizamos cruces a 17°C con los mismos genotipos pero menos numerosos. Dado que a 17°C la actividad del sistema UAS-GAL4 es menor (Ashburner 2005), cabía esperar un fenotipo menos severo. En lugar de obtener un 100% de letalidad larvaria, en las dos líneas RNAi-B2 se formaron algunas pupas que nunca llegaron a eclosionar. Por tanto, una inducción menos intensa de la interferencia del gen *d-mtTFB2* no era capaz de revertir el fenotipo de letalidad en el desarrollo.

2.4.2. Caracterización del estadio en que se detiene el desarrollo de las larvas RNAi-B2

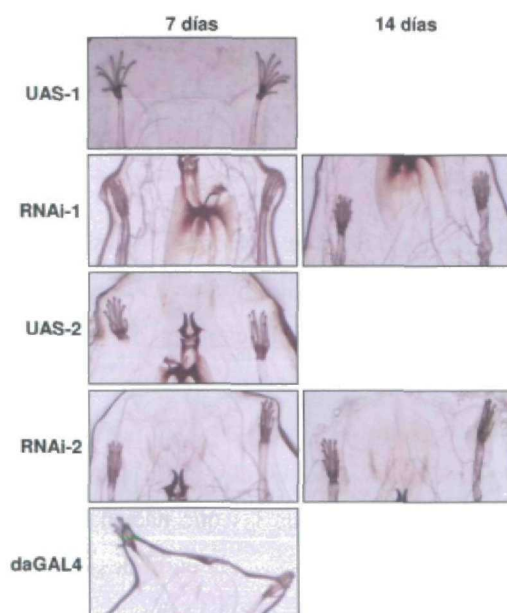


Figura 24. Espiráculos de larvas RNAi-B2. Las fotografías muestran los espiráculos de larvas RNAi-B2 recogidas 7 y 14 días después de la puesta. Como controles se utilizaron larvas de 7 días de las líneas parentales UAS-IRB2 y daGAL4. En las imágenes de todos los genotipos se observaron las ramificaciones características de espiráculos de larvas L3.

Con el objetivo de determinar con precisión el estadio en que se detenía el desarrollo de las larvas RNAi-B2, analizamos el aspecto de algunas estructuras larvarias. El estadio de desarrollo larvario puede reconocerse

mediante la observación de los espiráculos en la parte anterior de las tráqueas (Figura 24). Las larvas L1 carecen de estas estructuras y las larvas L2 sí los presentan pero sin las ramificaciones que caracterizan los espiráculos de larvas L3. La morfología de las mandíbulas también permite determinar el estadio larvario (Figura 25). A medida que la larva se va desarrollando, la mandíbula adquiere progresivamente un aspecto denticulado. Las larvas L1 tienen una mandíbula de superficie lisa, las larvas L2 presentan algún denticulo y las larvas L3 contienen una mandíbula totalmente denticulada.

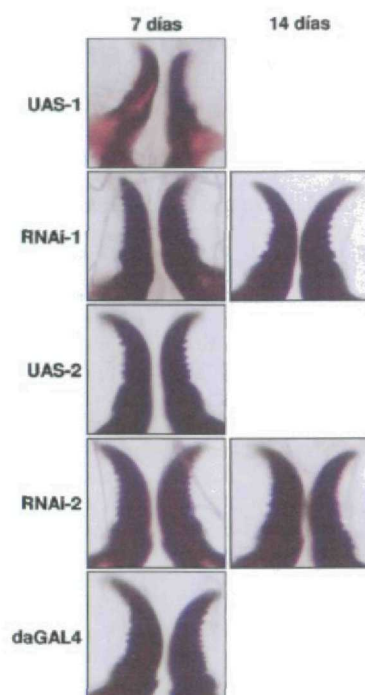


Figura 25. Mandíbulas de larvas RNAi-B2. Las fotografías muestran las mandíbulas de larvas RNAi-B2 recogidas 7 y 14 días después de la puesta. Como controles se utilizaron larvas de 7 días de las líneas parentales UAS-B2 y daGAL4. En las imágenes de todos los genotipos se observaron mandíbulas con aspecto completamente denticulado característico de larvas L3.

En conclusión, las imágenes de los espiráculos y las mandíbulas de las larvas RNAi-B2 nos permiten afirmar que éstas detienen su desarrollo una vez alcanzado el 3^{er} estadio larvario.

2.4.3. Medida de la masa y del tamaño de las larvas RNAi-B2

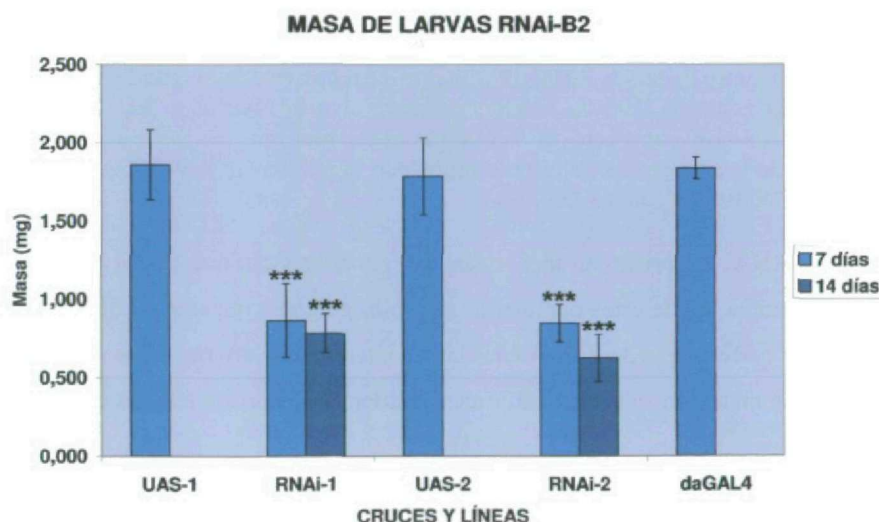


Figura 26. Masa de larvas RNAi-B2. La gráfica representa la masa media individual de larvas de 7 días de los distintos genotipos y también de 14 días en el caso de larvas interferidas. Existía una clara disminución en la masa de las larvas RNAi-B2 respecto a las líneas parentales que se utilizaron como control. La significación estadística de los resultados se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (***) indica $P < 0,001$.

Para determinar la masa de las larvas de las líneas RNAi-B2 y de las líneas parentales que se utilizaron como control, pesamos un mínimo de 5 grupos de 20-50 larvas de cada genotipo y calculamos la masa individual como un promedio de las medidas realizadas (Figura 26). Observamos que existía una reducción del 50% aproximadamente en la masa de las larvas RNAi-B2 si se comparaba con la masa de las líneas parentales que se utilizaron como control. Las larvas interferidas de 14 días tenían todavía una masa menor que las mismas de 7 días, lo cual demostraba que las larvas RNAi-B2 no sólo sufrían una parada en su desarrollo sino que también detenían su crecimiento.

Mediante observación directa, las larvas RNAi-B2 parecían más pequeñas y más delgadas que las larvas de la misma edad de las respectivas líneas parentales. Para medir con exactitud la longitud y el diámetro de las larvas interferidas y de la línea daGAL4 que se utilizó como control, se alinearon 20 larvas de cada genotipo mediante choque térmico en un portaobjetos y posteriormente se fotografiaron. Utilizando herramientas de tratamiento de imágenes se determinó la medida exacta de la longitud y el diámetro de cada larva, para calcular después el valor promedio de estos dos parámetros para cada genotipo (Figura 27). Claramente existía una disminución de la longitud y del diámetro de las larvas RNAi-B2 frente a los valores de las líneas parentales que se utilizaron como control.

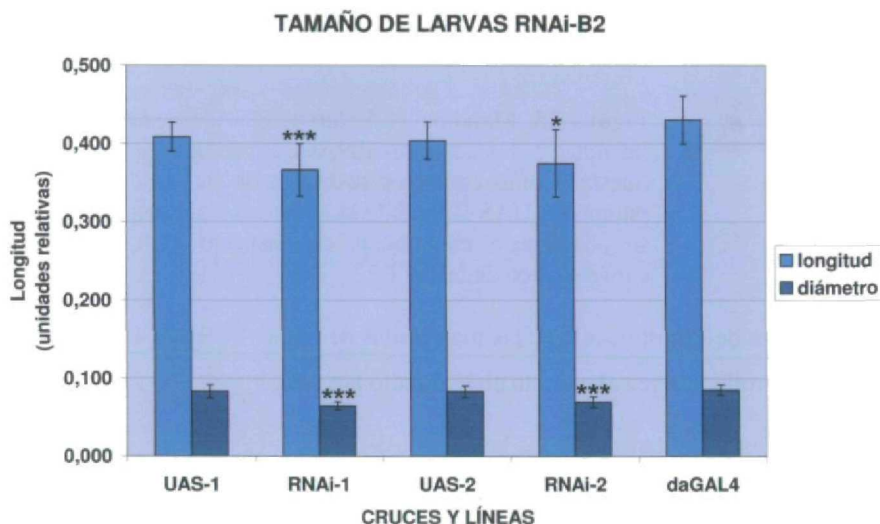


Figura 27. Longitud y diámetro de larvas RNAi-B2. La gráfica representa la longitud y el diámetro medio de larvas de 7 días de cada genotipo. Existía una disminución significativa tanto de la longitud como del diámetro en las larvas RNAi-B2 respecto de las líneas parentales que se utilizaron como control. La significación estadística de los resultados se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (* indica $P < 0,05$; *** indica $P < 0,001$).

En resumen, las larvas RNAi-B2 presentan menor tamaño y menor masa que las larvas de las respectivas líneas parentales. La disminución de estos parámetros se produce en una relación tal que, si se considerasen las larvas como cilindros perfectos, la densidad de las larvas interferidas variaría. Éstas tendrían una densidad menor que las líneas parentales, lo que implicaría que tendrían o menor número de células o células más pequeñas.

2.4.4. Efectos del aporte exógeno de ecdisona en las larvas RNAi-B2

La progresión del ciclo vital de *D.melanogaster* a lo largo del desarrollo, al igual que el de otros insectos, depende, entre otros factores, del equilibrio hormonal entre la ecdisona (20-HE) y la hormona juvenil (JH). El balance de los niveles de 20-HE y JH determina las transiciones entre los distintos estadios del desarrollo

que, generalmente, están producidos por picos de 20-HE. Trabajos previos de otros grupos habían demostrado que el suministro oral de ecdisona revertía el fenotipo de retraso y/o parada en el desarrollo durante la fase larvaria provocado por diversas mutaciones (Freeman et al. 1999; Gaziova et al. 2004).

Para ver los efectos que producía el aporte exógeno de 20-HE sobre larvas RNAi-B2, recogimos aproximadamente 100 larvas L2 de cada genotipo y de la línea daGAL4 que se utilizó como control. La mitad de las larvas de cada genotipo se transfirieron a viales con 20-HE disuelto en 10% etanol y la otra mitad a viales que sólo contenían 10% etanol. No observamos ningún efecto de la hormona 20-HE sobre el desarrollo de las larvas RNAi-B2. A la vista de los resultados que obtuvimos, podíamos afirmar que esta hormona por sí sola no era capaz de revertir la parada en el desarrollo provocada por la ausencia de función de d-mtTFB2.

GENOTIPO	TRATAMIENTO	LARVAS L2 (n)	PUPAS (n)	ADULTOS (n)
RNAi-1	-	50	1	1
	+ 20-HE	50	5	5
RNAi-2	-	50	-	-
	+ 20-HE	50	-	-
daGAL4	-	50	48	48
	+ 20-HE	50	45	45

Tabla 5. Efectos del aporte exógeno de ecdisona (20-HE) en larvas RNAi-B2. Se partió de 100 larvas L2 de cada genotipo y el 50% de ellas recibió tratamiento con 20-HE disuelta en 10% etanol y el otro 50% recibió sólo 10% etanol. Como control se utilizó la línea daGAL4. La tabla recoge el número de pupas que se formaron y de adultos que eclosionaron en cada caso. El suministro oral de ecdisona no tenía ningún efecto sobre el desarrollo de las larvas RNAi-B2.

2.5. Caracterización molecular de las larvas RNAi-B2

Una vez establecidos los rasgos fenotípicos de las larvas RNAi-B2, procedimos a analizar en detalle las consecuencias de la RNAi del gen *d-mtTFB2* a nivel molecular. Determinamos la evolución a lo largo del desarrollo larvario de los niveles de ARNm correspondientes a los genes *d-mtTFB2* y *d-mtTFB1*, así como la cantidad de las proteínas d-mtTFB2 y d-mtTFB1 existentes en el estadio L3. Además, analizamos los niveles de expresión de algunos genes codificados en el genoma mitocondrial y la cantidad de ADNmt en larvas RNAi-B2, como posibles parámetros susceptibles de modificación a causa del silenciamiento de d-mtTFB2.

2.5.1. Niveles de expresión de los genes *d-mtTFB2* y *d-mtTFB1* en las larvas RNAi-B2

Aunque sabíamos por experimentos previos de qRT-PCR que la RNAi del gen *d-mtTFB2* estaba siendo efectiva en las larvas RNAi-B2, quisimos determinar la evolución de los niveles de ARNm d-mtTFB2 a lo largo del desarrollo. Asimismo nos pareció interesante analizar los niveles de ARNm d-mtTFB1 en las larvas RNAi-B2 para comprobar si existía alguna variación en la expresión de este gen respecto a las líneas control. Los niveles de ARNm se determinaron por qRT-PCR. Para ello se recogieron larvas cada tres días a partir del día 3 después de la puesta y hasta los días 21-27, en el caso de las líneas interferidas, o hasta el día 9, antes de que se produjera la pupación, en el caso de las líneas parentales que se utilizaron como control. Las cantidades de ARNm obtenidas para cada gen se normalizaron frente a los niveles de ARNm correspondientes al gen nuclear que codifica la subunidad de 140 kDa de la ARN-polimerasa II, de expresión constitutiva, y se expresaron en función de los niveles de expresión de la línea daGAL4 considerada como referencia y a la que se le asignó el valor 1 (Figura 28).

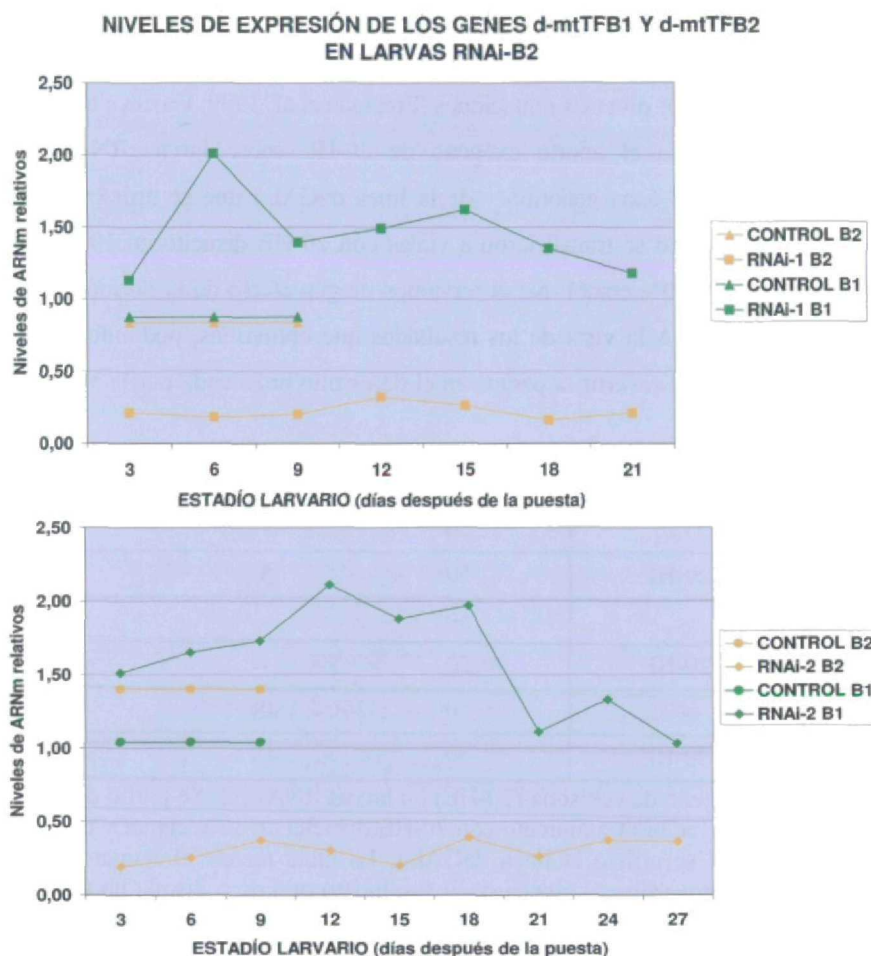


Figura 28. Niveles de expresión de los genes *d-mtTFB2* y *d-mtTFB1* en larvas RNAi-B2 medidos por qRT-PCR. Las concentraciones de los ARNm obtenidas para cada gen se normalizaron frente a los niveles de expresión del gen *RNApolII* y se relativizaron respecto a la línea daGAL4 que se tomó como referencia. Como control se consideró el promedio de los niveles relativos de cada ARNm en las líneas parentales UAS-IRB2 y daGAL4. En las dos líneas RNAi-B2 se observaba una reducción por debajo del 50% en la expresión del gen *d-mtTFB2* a lo largo de la etapa larvaria. Por el contrario, los niveles de expresión del gen *d-mtTFB1* se incrementaban desde el inicio del estadio larvario hasta duplicarse y luego disminuían. Los datos proceden de tres experimentos independientes y, de acuerdo con la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni, son estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

Tanto en la línea RNAi-1 como en la línea RNAi-2 los niveles de expresión del gen *d-mtTFB2* caían por debajo del 40%, a consecuencia de la interferencia del mismo, a lo largo de todo el estadio larvario. A diferencia del anterior, la expresión del gen *d-mtTFB1* se incrementaba desde el inicio de la etapa larvaria hasta duplicarse. En el caso de la línea RNAi-1, el pico máximo de ARNm *d-mtTFB1* se producía el día 6 después de la puesta y posteriormente los niveles de expresión de este gen se mantenían algo elevados aunque disminuían progresivamente. En las larvas RNAi-2 los niveles de expresión del gen *d-mtTFB1* aumentaban desde el inicio del desarrollo, alcanzaban un máximo el día 12 después de la puesta y se mantenían elevados hasta el día 21.

En conclusión, la interferencia del gen *d-mtTFB2* se estaba produciendo a lo largo de todo el estadio larvario y se correlacionaba con un incremento transitorio en los niveles de expresión del gen *d-mtTFB1*. Este fenómeno podía tratarse de un mecanismo compensatorio para solventar la falta de *d-mtTFB2* y planteaba la posibilidad de que el organismo fuese capaz de detectar la ausencia de función de esta proteína y poner en marcha un programa de expresión génica que intentase compensar su defecto.

Para comprobar que los niveles de ARNm se correspondían con los niveles de proteína, analizamos por Western Blot la cantidad de proteína d-mtTFB2 y d-mtTFB1 existente en larvas L3 (Figura 29). Como controles se utilizaron las líneas parentales UAS-IRB2 y daGAL4. Los resultados demostraron que existía una disminución en los niveles de proteína d-mtTFB2 en las líneas RNAi-B2 y que se producía una sobreexpresión de la proteína d-mtTFB1, aunque ésta era menos evidente en la línea RNAi-2 que en la línea RNAi-1.

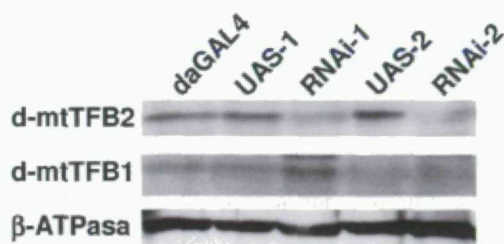


Figura 29. Niveles de proteína d-mtTFB2 y d-mtTFB1 en larvas RNAi-B2 de 7-14 días analizados por Western Blot. 20µg de proteínas mitocondriales de cada genotipo se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos específicos contra d-mtTFB2 y d-mtTFB1. Como control de carga se utilizó la proteína β-ATPasa.

2.5.2. Niveles de expresión de genes codificados en el genoma mitocondrial en las larvas RNAi-B2

Puesto que se había propuesto que las proteínas d-mtTFB1 y d-mtTFB2 podían funcionar como factores de transcripción mitocondriales, decidimos analizar los niveles de expresión de algunos genes codificados en el genoma mitocondrial para comprobar el papel de ambas proteínas en la transcripción del ADNmt (Figura 30).

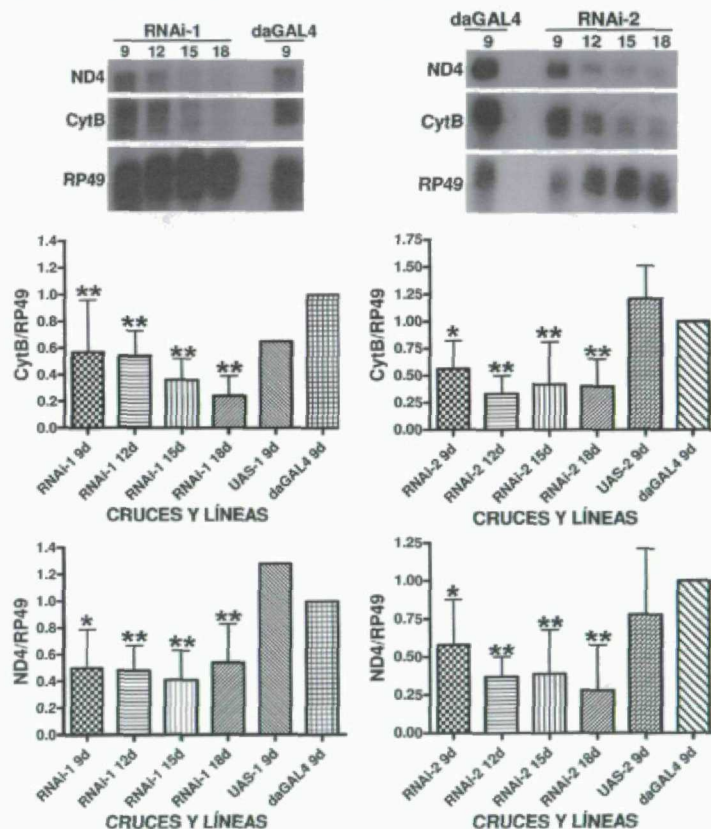


Figura 30. Efectos de la RNAi del gen *d-mtTFB2* sobre la transcripción mitocondrial. 5µg de ARN total extraído de larvas de los distintos genotipos en los días que se indican después de la puesta se separaron por electroforesis en geles de agarosa-formaldehído, se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con sondas radiactivas correspondientes a los genes mitocondriales *ND4* y *CytB* y al gen nuclear *RP49*. Los niveles de expresión relativos respecto a la línea parental daGAL4 se obtuvieron normalizando la cantidad de transcritos mitocondriales frente a los niveles de *RP49* en cada genotipo. Los datos proceden de al menos tres experimentos independientes y la significación estadística se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Dunnett (* indica $P<0,05$; ** indica $P<0,01$).

Los niveles de expresión de los genes *ND4* y *CytB* se midieron por Northern Blot empleando ARN total extraído de larvas recogidas 9, 12, 15 y 18 días después de la puesta. Como control de carga se utilizó el gen nuclear RP49 de expresión constitutiva.

En la línea RNAi-1 se observaba una disminución de los niveles de todos los transcritos mitocondriales respecto a la línea daGAL4 que se tomó como referencia. La expresión del gen *ND4* se reducía significativamente en torno a un 50% y los niveles de ARNm del gen *CytB* caían progresiva y significativamente a lo largo de la etapa larvaria. En la línea RNAi-2, los niveles de expresión de los genes *ND4* y *CytB* se veían reducidos significativamente por debajo de la mitad de los valores referencia correspondientes a la línea daGAL4.

A la vista de estos resultados, podíamos concluir que el factor d-mtTFB2 resultaba esencial para la transcripción del ADNmt y que su función como tal no podía ser reemplazada por la proteína d-mtTFB1, ni siquiera a pesar de incrementar esta última su nivel de expresión.

2.5.3. Niveles de ADNmt en las larvas RNAi-B2

Si, como sugerían fuertemente los resultados anteriores, la proteína d-mtTFB2 participaba activamente en la transcripción del genoma mitocondrial y era el único factor de transcripción funcional existente en la mitocondria, era probable que los niveles de ADNmt pudieran verse también afectados puesto que la síntesis del cebador de ARN, a partir del cual se inicia la replicación del ADNmt, depende de la transcripción del ADNmt.

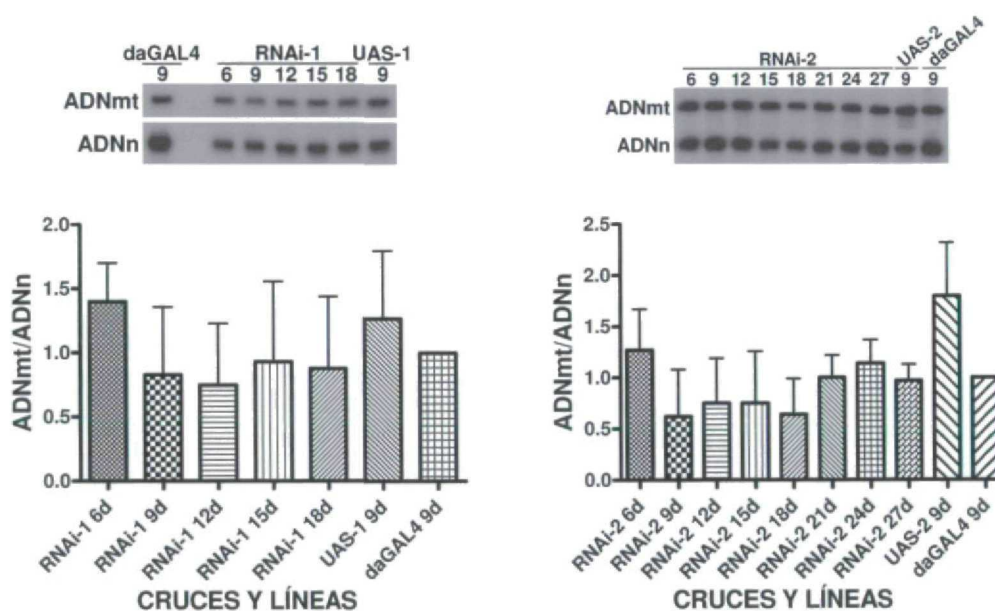


Figura 31. Efectos de la RNAi del gen *d-mtTFB2* sobre la cantidad de ADNmt. 5ug de ADN total extraído de larvas RNAi-B2 los días que se indican después de la puesta se digirieron con XhoI y los fragmentos generados se separaron por electroforesis en geles de agarosa. Estos fragmentos se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con las sondas radiactivas correspondientes al “cluster” de histonas y al gen *CytB* codificados en los genomas nuclear y mitocondrial respectivamente. Los niveles de ADNmt se normalizaron frente a la cantidad de ADNn en cada caso y se relativizaron respecto a la línea daGAL4 que se tomó como referencia. Los datos proceden de al menos cuatro experimentos independientes y la significación estadística se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Dunnett.

Los niveles de ADNmt se determinaron por Southern Blot empleando ADN total extraído de larvas de 6-18 días de edad de la línea RNAi-1, de 6-27 días de la línea RNAi-2 y de 9 días de las líneas parentales que se

utilizaron como control (Figura 31). Para normalizar la cantidad de ADN cargada se utilizó una sonda contra el “cluster” de histonas codificado en el genoma nuclear.

En la línea RNAi-1 los niveles de ADNmt disminuían ligeramente respecto a las dos líneas parentales que se emplearon como control aunque las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas. En la línea RNAi-2 la cantidad de ADNmt caía hasta casi un 50% en algunos casos y las diferencias observadas eran significativas frente a la línea UAS-2 pero no frente a la línea daGAL4.

Basándonos en estos resultados no podíamos concluir que existiera una disminución significativa de los niveles de ADNmt en las larvas RNAi-B2, aunque sí se observaba una clara tendencia a contener menor cantidad de ADNmt en estas larvas que en las larvas control. Puesto que no se estaba logrando una interferencia del gen *d-mtTFB2* del 100%, podía estar ocurriendo que la proteína d-mtTFB2 existente fuera suficiente para evitar grandes variaciones en los niveles de ADNmt pero que resultara insuficiente para mantener constantes los niveles de transcripción de los genes mitocondriales.

2.6. Caracterización bioquímica de las larvas RNAi-B2

Si a consecuencia de la RNAi del gen *d-mtTFB2* se producía una reducción en los niveles de transcripción del ADNmt, cabía esperar que la función mitocondrial se viera afectada puesto que los 13 polipéptidos codificados en el genoma mitocondrial forman parte esencial de los complejos proteicos que componen el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Decidimos analizar la actividad de los distintos complejos OXPHOS y la capacidad mitocondrial de síntesis de ATP para comprobar si, efectivamente, el silenciamiento del gen *d-mtTFB2* tenía algún efecto funcional sobre la actividad y el metabolismo mitocondrial.

2.6.1. Análisis de la actividad de los complejos OXPHOS en las larvas RNAi-B2

Para determinar la actividad de los complejos de la cadena respiratoria se prepararon extractos de proteínas mitocondriales a partir de 30-50 mg de larvas recogidas 7-18 días después de la puesta en el caso de las líneas interferidas o de larvas de 7 días en el caso de las líneas parentales que se utilizaron como control.

Como se aprecia en las gráficas de la figura 32, se producía una disminución progresiva en el tiempo de la actividad de los complejos I, III y IV mientras que la actividad succinato deshidrogenasa (SDH) y la del complejo II completo aumentaban. Asimismo se observaba un incremento de la actividad citrato sintasa, utilizada habitualmente como una medida de masa mitocondrial. Todas las variaciones de las actividades específicas de los distintos complejos eran estadísticamente significativas cuando se comparaban con los valores de las líneas parentales empleadas como control.

Analizando estos resultados podemos concluir que la actividad de los complejos de la cadena respiratoria que contenían alguna subunidad codificada en el genoma mitocondrial disminuía como consecuencia de los defectos producidos en la transcripción del ADNmt por la interferencia del gen *d-mtTFB2*. Por el contrario, la actividad del complejo II, el único codificado exclusivamente en el genoma nuclear, experimentaba una fuerte subida al igual que la actividad citrato sintasa codificada también en el núcleo. Esto último podría estar reflejando un aumento de la masa mitocondrial, en un intento por parte de las células de compensar el déficit de función mitocondrial causado por la interferencia del gen *d-mtTFB2*. Si este planteamiento fuera cierto, el incremento de masa mitocondrial producido no sería suficiente para restablecer los niveles de actividad OXPHOS normales, ya que las nuevas mitocondrias generadas tampoco dispondrían de transcritos mitocondriales en cantidad adecuada para dar lugar a un sistema OXPHOS operativo. Sin embargo, los datos

disponibles no son suficientes para concluir que exista un incremento de masa mitocondrial. La subida de la actividad citrato sintasa podría deberse también a un efecto compensatorio del ciclo de Krebs que intentara funcionar de modo más activo.

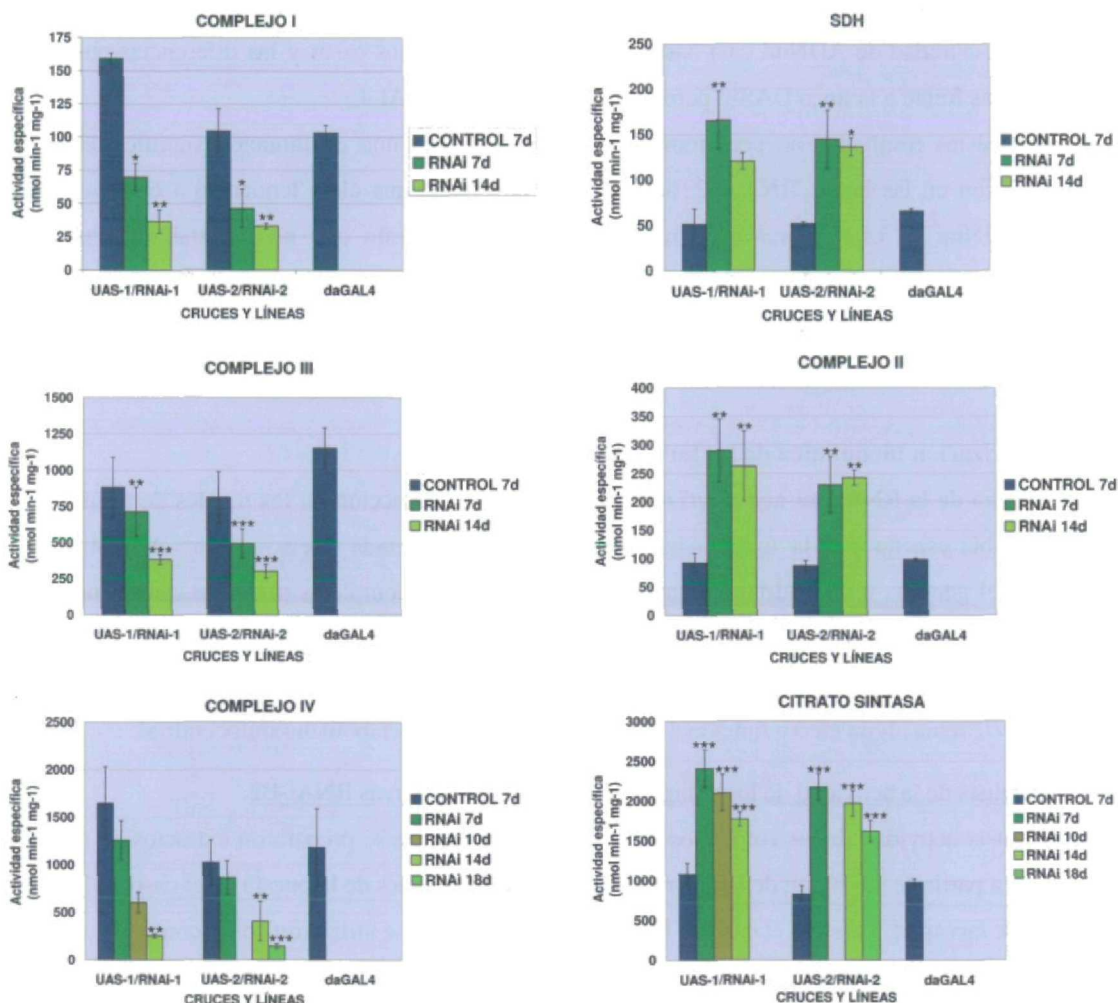


Figura 32. Actividad de los complejos OXPHOS en larvas RNAi-B2. La actividad específica de los complejos OXPHOS se midió en extractos de proteínas mitocondriales obtenidos a partir de larvas de los distintos genotipos recogidas los días que se indican después de la puesta. Como controles se emplearon las líneas parentales UAS-IRB2 y daGAL4. Los datos proceden de tres experimentos independientes y la significación estadística se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (* indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$; *** indica $P < 0,001$).

2.6.2. Análisis de la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial en las larvas RNAi-B2

Puesto que las larvas RNAi-B2 presentaban una reducción drástica de la actividad de los complejos I, III y IV de la cadena de transporte electrónico, parecía lógico pensar que la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial estuviera también afectada.

Para medir la capacidad mitocondrial de síntesis de ATP de las larvas RNAi-B2, se prepararon extractos de proteínas mitocondriales según se describe en Materiales y Métodos a partir de larvas de 7 y 14 días de edad en el caso de la línea RNAi-2 y de 7 días en el caso de la línea RNAi-1 y de las líneas parentales que se emplearon como control. Utilizando como sustratos glutamato y malato, se cuantificó la cantidad de ATP que podía ser sintetizada por estos extractos.

En la figura 33 se observa cómo la capacidad mitocondrial de síntesis de ATP de las larvas RNAi-B2 estaba

fuertemente disminuida. Se producía una caída significativa y progresiva en el tiempo de la cantidad de ATP sintetizado por el complejo V o ATP-sintasa. La reducción de la actividad del complejo V tenía una justificación doble. Por una parte, este complejo contiene subunidades codificadas en el genoma mitocondrial por lo que, al igual que los complejos I, III y IV, también se veía afectado por el defecto en la transcripción del ADNmt provocado por la RNAi del gen *d-mtTFB2*; por otra, la caída de la actividad de los complejos que lo preceden en la cadena de transporte electrónico provocaba una disminución del gradiente de H^+ generado a través de la membrana mitocondrial interna lo que se traduce en una menor capacidad de síntesis de ATP.

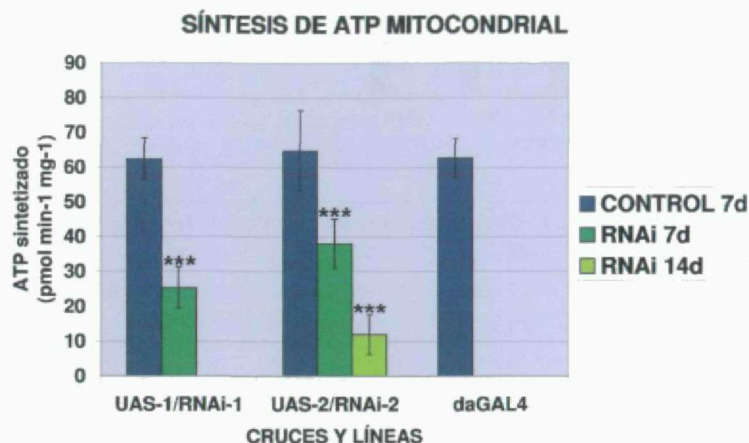


Figura 33. Capacidad de síntesis de ATP mitocondrial en larvas RNAi-B2. La capacidad de síntesis de ATP por parte de las mitocondrias de larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2* se determinó en extractos mitocondriales frescos preparados en condiciones fisiológicas a partir de larvas en los días que se indican después de la puesta. Como sustrato se empleó una mezcla 1:1 de glutamato y malato. Los resultados están expresados en picomoles de ATP sintetizado por minuto y por miligramo de proteína mitocondrial. Como controles se emplearon las líneas parentales UAS-IRB2 y daGAL4. Los datos proceden de tres experimentos independientes y la significación estadística se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (***) indica $P < 0,001$.

2.6.3. Análisis de la ruta glucolítica en las larvas RNAi-B2

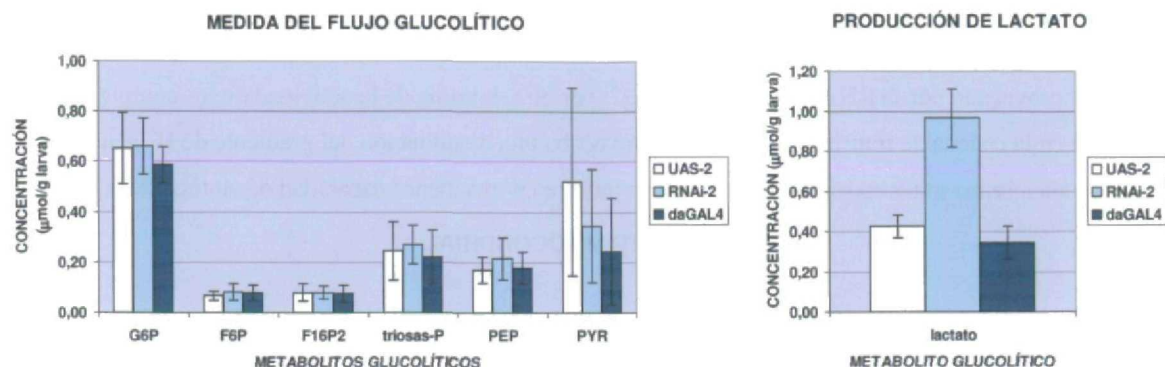
Los resultados del estudio del metabolismo energético mitocondrial en las larvas RNAi-B2 demostraba claramente un defecto en la actividad del sistema de fosforilación oxidativa, que se traducía en una capacidad de síntesis de ATP mitocondrial muy reducida. No obstante, aunque estas larvas sufrían una parada en su desarrollo, eran capaces de vivir durante 25-30 días aproximadamente. Inmediatamente surgía la pregunta: ¿de dónde obtenían las larvas RNAi-B2 la energía celular suficiente para prolongar el estadio larvario de tal forma? Si el ATP mitocondrial disponible resultaba insuficiente, era muy probable que la glucolisis aportara la cantidad de ATP restante necesaria para garantizar la viabilidad de estas larvas.

Decidimos analizar cuál era el estado de la ruta glucolítica en las larvas RNAi-B2 para comprobar si existía alguna diferencia respecto a las larvas control. En primer lugar medimos una serie de metabolitos intermedios y finales de la glucolisis para determinar si se habían producido variaciones en el flujo glucolítico y, posteriormente, cuantificamos la actividad del enzima fosfofructoquinasa por tratarse de un enzima clave en esta ruta, muy finamente regulado y que cataliza una etapa limitante de la misma.

2.6.3.1. Medida del flujo glucolítico

Para determinar si se habían producido modificaciones en el flujo de la glucolisis comparamos la concentración de la mayor parte de los metabolitos glucolíticos presentes en las larvas RNAi-2 con los valores de las larvas parentales UAS-2 y daGAL4 empleados como referencia (Figura 34). Las medidas

espectrofotométricas se realizaron en extractos totales preparados a partir de 0,5 g de larvas de cada genotipo. Los datos corresponden a medidas por triplicado de dos experimentos independientes.



METABOLITO	UAS-2 (μmol/g)	RNAi-2 (μmol/g)	daGAL4 (μmol/g)
Glucosa-6-fosfato	0,65 ± 0,14	0,66 ± 0,11	0,59 ± 0,07
Fructosa-6-fosfato	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03
Fructosa-1,6-bifosfato	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03
Triosas-fosfato	0,24 ± 0,12	0,27 ± 0,08	0,22 ± 0,11
Fosfoenolpiruvato	0,17 ± 0,05	0,21 ± 0,08	0,18 ± 0,06
Piruvato	0,52 ± 0,37	0,35 ± 0,23	0,24 ± 0,21
Lactato	0,43 ± 0,06	0,97 ± 0,14	0,34 ± 0,08

Figura 34. Efectos de la RNAi del gen *d-mtTFB2* sobre el flujo glucolítico. Para determinar el flujo de la glucólisis se midió la concentración de diferentes metabolitos en extractos totales de larvas de los genotipos que se indican en la leyenda. Las líneas parentales UAS-2 y daGAL4 se tomaron como referencia. Los datos proceden de seis medidas realizadas en dos experimentos independientes y la significación estadística de los resultados se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (***) indica $P < 0,001$).

Los resultados obtenidos demostraban que existía una acumulación considerable de lactato en las larvas RNAi-2. Esto significaba que la vía glucolítica estaba activada y que el piruvato producido se convertía en lactato mediante la acción del enzima lactato deshidrogenasa. La finalidad de la conversión del piruvato en lactato es la de regenerar NAD^+ para mantener la ruta glucolítica operativa y, así, garantizar la obtención de ATP vía glucólisis puesto que la disponibilidad de ATP mitocondrial en estas larvas estaba muy limitada. El hecho de que solamente se observara acumulación de lactato, y no de piruvato ni de ningún metabolito intermediario de la glucólisis, era compatible con un incremento del flujo glucolítico, ya que los niveles estacionarios de cualquier metabolito de las etapas intermedias no tenían por qué verse afectados.

2.6.3.2. Medida de la actividad fosfofructoquinasa

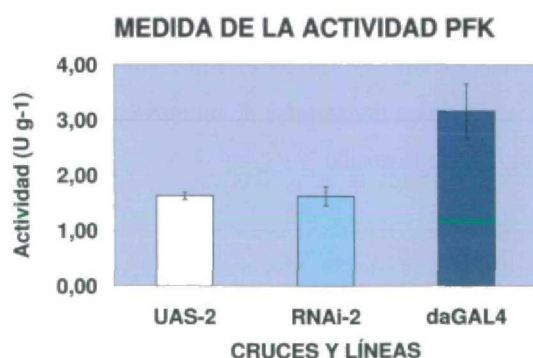


Figura 35. Actividad del enzima PFK en larvas RNAi-B2. La actividad del enzima PFK se determinó a partir de extractos de proteína total obtenidos de larvas de 7 días de edad de los genotipos que se indican. La medida se realizó en condiciones de $V_{\text{máx}}$ empleando la concentración de efectores adecuada. Los datos corresponden a seis medidas realizadas en dos experimentos independientes.

Para determinar la actividad específica del enzima fosfofructoquinasa (PFK) se prepararon extractos de proteína total a partir de larvas de 7 días de edad de la línea RNAi-2 y de sus respectivas líneas parentales UAS-2 y daGAL4 que se utilizaron como control (Figura 35). La actividad PFK se midió espectrofotométricamente en condiciones de velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) para el enzima empleando la concentración de efectores adecuada y se expresó en unidades por gramo de larva ($U \cdot g^{-1}$).

Los resultados obtenidos mostraban que el nivel de actividad PFK de las líneas parentales difería, siendo la actividad de la línea interferida RNAi-2 similar a la de la línea UAS-2 y ambos valores inferiores al de la línea daGAL4. No podíamos afirmar que existieran cambios en la actividad total del enzima y, en consecuencia, tampoco podíamos concluir que se hubieran producido alteraciones en su expresión génica.

2.6.3.3. Medida del balance energético

En los mismos extractos totales en los que habíamos medido el flujo glucolítico determinamos la concentración de los nucleótidos ATP, ADP y AMP para valorar el balance energético total de las larvas RNAi-B2 (Figura 36).

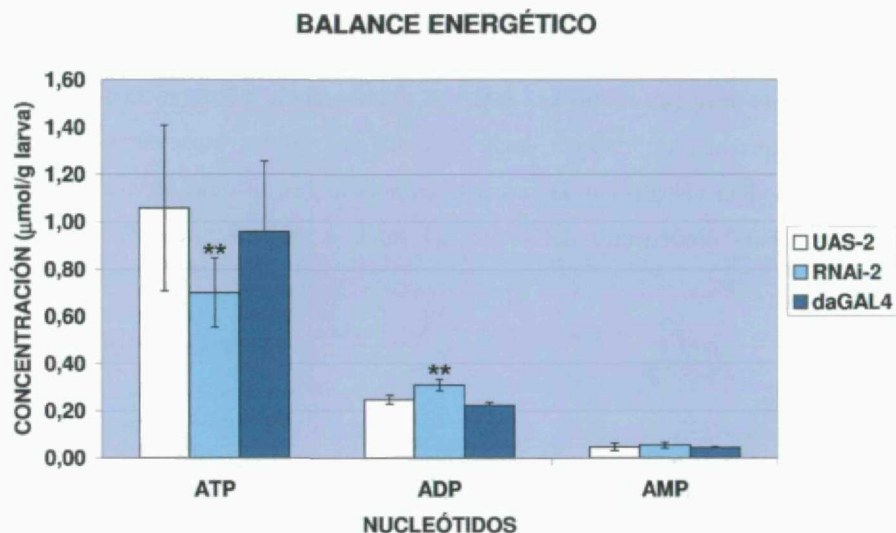


Figura 36. Balance energético de las larvas RNAi-B2. La concentración de los nucleótidos ATP, ADP y AMP se determinó espectrofotométricamente en extractos totales de larvas de los genotipos que se indican en la leyenda. Las líneas parentales UAS-2 y daGAL4 se tomaron como referencia. Los datos proceden de seis medidas realizadas en dos experimentos independientes y la significación estadística de los resultados se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (** indica $P < 0,01$).

A pesar del incremento del flujo glucolítico y de la acumulación de lactato, las larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2* no conseguían compensar el defecto de síntesis de ATP mitocondrial. Las larvas RNAi-2 presentaban niveles de ATP totales un 30% menores que las larvas control. Probablemente estos niveles de ATP resultaban insuficientes para el correcto desarrollo de estas larvas aunque sí eran suficientes para la prolongación de la vida en el estadio larvario.

En conclusión, las larvas RNAi-B2 aumentaban su flujo glucolítico y producían más lactato para intentar mantener el balance energético en niveles similares a los de las larvas control. A pesar de ello, las larvas interferidas presentaban menor cantidad de ATP y mayor cantidad de ADP que las larvas control, lo cual demostraba que sufrían claramente un defecto energético.

2.7. Caracterización del desarrollo tisular de las larvas RNAi-B2

Además del estudio a nivel fenotípico, molecular y bioquímico, nos pareció esencial analizar cuál era el estado de los tejidos que integraban las larvas RNAi-B2. Resultaba interesante saber si los distintos tipos celulares se habían diferenciado correctamente a lo largo del desarrollo y si los órganos y tejidos presentes en las larvas interferidas tenían el aspecto, el tamaño y la morfología adecuada. También consideramos importante determinar cuál era la situación en estas larvas de los primordios o discos imaginales, a partir de los cuales deberían haberse desarrollado las estructuras del organismo adulto mediante el proceso de metamorfosis que tiene lugar durante la pupación. Nuestro objetivo consistía en demostrar si el defecto energético que sufrían las larvas RNAi-B2 había interferido con el proceso de morfogénesis o si había alterado los patrones de expresión génica.

2.7.1. Análisis del sistema muscular de las larvas RNAi-B2

Para evaluar el estado del tejido muscular en las larvas RNAi-B2 se generó un stock cuyo genotipo era $w;miolacZ/miolacZ;UAS-2/UAS-2$. Estas moscas contenían, además del transgén *UAS-IRB2* en homocigosis en el cromosoma III, el transgén *lacZ* bajo control del promotor del gen de la miosina en homocigosis en el cromosoma II. Al cruzar esta línea con el “driver” daGAL4 se producía la interferencia del gen *d-mtTFB2* al mismo tiempo que se expresaba el transgén *lacZ* en todos los tejidos musculares. Mediante tinción histoquímica con X-Gal podían visualizarse las estructuras musculares de estas larvas (Figura 37). Como controles se utilizaron larvas procedentes del cruce del stock $w;miolacZ/miolacZ;+/+$ con el “driver” daGAL4.

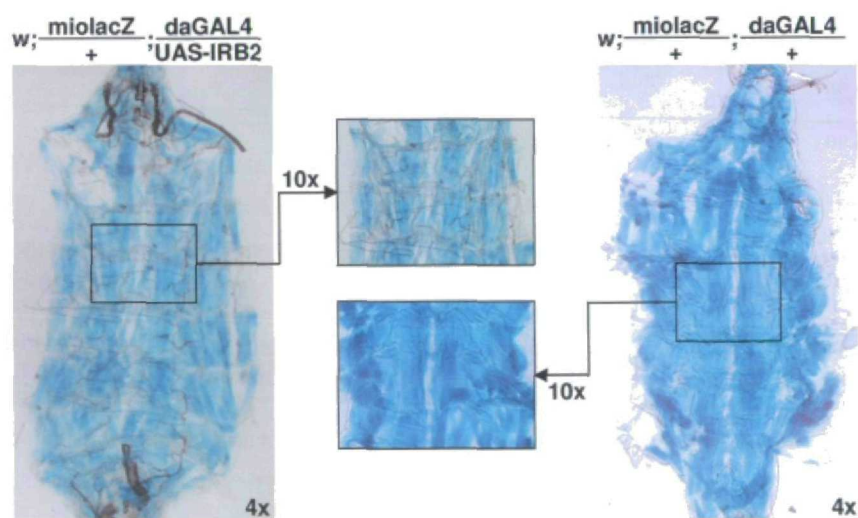


Figura 37. Efectos de la RNAi del gen *d-mtTFB2* en el sistema muscular larvario. Para visualizar el tejido muscular mediante tinción histoquímica con X-Gal se diseccionaron larvas de 9 días de edad de los genotipos que se indican. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio utilizando objetivos de 4 y 10 aumentos respectivamente.

Como se puede observar en la figura 37, no se apreciaban diferencias entre el tejido muscular de las larvas interferidas y de las larvas control. Los paquetes musculares en disposición longitudinal se observaban por igual en ambos tipos de larvas. A la vista de estas imágenes podíamos concluir que, al menos a nivel estructural, la RNAi del gen *d-mtTFB2* no tenía ningún efecto sobre la morfogénesis del sistema muscular larvario.

2.7.2. Análisis del sistema nervioso de las larvas RNAi-B2

Para visualizar el sistema nervioso de las larvas RNAi-B2 realizamos una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-HRP que reconoce específicamente todas las estructuras del sistema nervioso central y periférico de *D.melanogaster* (Figura 38). Para ello se diseccionaron larvas de 9 y 18 días de edad en el caso de los cruces RNAi-B2 y de larvas de 9 días en el caso de la línea parental daGAL4 que se utilizó como control.

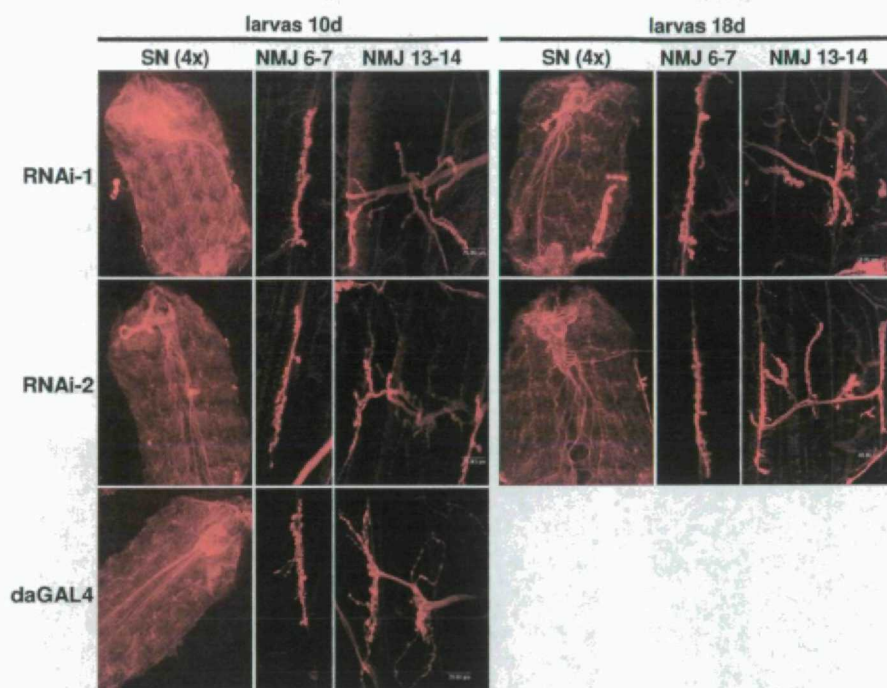


Figura 38. Efectos de la RNAi del gen *d-mtTFB2* en el sistema nervioso larvario. Para visualizar el sistema nervioso mediante tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-HRP se diseccionaron larvas RNAi-B2 de 9 y 18 días de edad. Como control se diseccionaron larvas de 9 días de la línea parental daGAL4. Las imágenes del sistema nervioso completo se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 4x. Las imágenes de las uniones neuromusculares (NMJ) entre las fibras 6-7 y 13-14 del 3^{er} segmento abdominal se obtuvieron por microscopía confocal.

En las imágenes de microscopía de fluorescencia de las larvas enteras se observaba que, tanto en las larvas interferidas como en las larvas control, el sistema nervioso se había desarrollado adecuadamente. El sistema nervioso central posicionado en la parte anterior presentaba el aspecto esperado y de él partían en sentido longitudinal y hacia la parte posterior las fibras nerviosas. También se observaban las ramificaciones de estas fibras principales que inervaban los músculos que habían quedado fijados a la cutícula durante el proceso de disección. Las imágenes de las uniones neuromusculares entre las fibras 6-7 y 13-14 obtenidas por microscopía confocal demostraban que la morfología y el tamaño de las mismas era similar en las larvas RNAi-B2 y en las larvas control. Todas ellas tenían el aspecto granuloso característico de uniones musculares funcionales y que es debido a la presencia de numerosos botones sinápticos a lo largo de las mismas.

2.7.3. Análisis de los discos imaginales de las larvas RNAi-B2

Para analizar el estado de los discos imaginales de las larvas RNAi-B2 decidimos evaluar el patrón de expresión de algún gen de desarrollo bien caracterizado y los niveles de apoptosis en los discos de ala. Los resultados de este análisis nos indicarían si los discos imaginales tenían la morfología esperada, si los genes implicados en desarrollo se estaban expresando en los territorios adecuados y si había o no un exceso de

muerte celular programada. Podría ocurrir que, a consecuencia de una situación energética deficiente como la que presentaban las larvas RNAi-B2, los primordios imaginales no se hubieran desarrollado correctamente y, ante la imposibilidad de generar las estructuras de la mosca adulta, se hubiera inducido la entrada en apoptosis de las células que conforman estos tejidos.

2.7.3.1. Expresión del gen *wingless* en los discos imaginales de ala

Para comprobar si los genes implicados en desarrollo se estaban expresando según el patrón espacio-temporal esperado escogimos el gen *wingless* como marcador. Este gen posee un patrón de expresión que está perfectamente caracterizado en los discos imaginales de ala.

La expresión de *wingless* (*wg*) se visualizó en discos imaginales de ala diseccionados a partir de larvas RNAi-B2 de 8-15 días de edad y de larvas salvajes de 3^{er} estadio (Figura 39). La detección inmunohistoquímica se realizó con un anticuerpo anti-*wg* obtenido en ratón. En el caso de las larvas interferidas se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC mientras que en las larvas control el mismo anticuerpo estaba acoplado al fluorocromo Rhodamine Red.

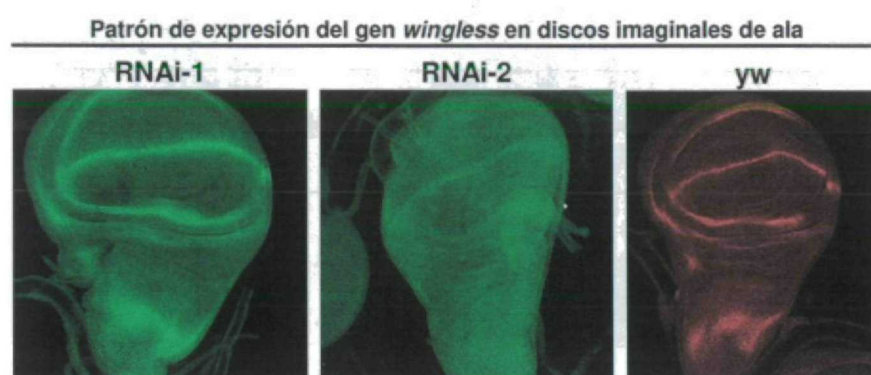


Figura 39. Patrón de expresión del gen *wingless* en discos imaginales de ala de larvas RNAi-B2. Los discos imaginales de ala se aislaron de larvas RNAi-B2 de 8-15 días de edad. Como control se emplearon larvas *yw* de 3^{er} estadio. La detección inmunohistoquímica del gen *wg* se realizó con un anticuerpo primario anti-*wg* obtenido en ratón y con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo FITC, que emite en verde, en el caso de las larvas RNAi-B2 o al fluorocromo Rhodamine Red, que emite en rojo, en el caso de las larvas control. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal.

Las imágenes demostraban que los discos imaginales de ala de la línea RNAi-1 presentaban el patrón de expresión del gen *wg* esperado mientras que los discos de la línea RNAi-2 eran algo más pequeños y en ellos el patrón de expresión de *wg* era también correcto, aunque todavía no se había definido completamente. Por tanto, aparentemente la interferencia del gen *d-mtTFB2* no tenía ningún efecto sobre el patrón de expresión espacial de los marcadores de desarrollo pero sí sobre su patrón de expresión temporal. Las larvas interferidas tardaban más tiempo en definir los patrones espaciales de expresión génica que las larvas control.

2.7.3.2. Niveles de apoptosis en los discos imaginales de ala

Para visualizar los niveles de apoptosis en los discos imaginales de ala de las larvas RNAi-B2 realizamos una tinción inmunocitoquímica de las células apoptóticas con un anticuerpo anti-caspasa3 activada, ya que estas células expresan específicamente esta forma de la proteína (Figura 40). Los discos imaginales se aislaron de larvas de 15 días de edad en el caso de las líneas interferidas y de larvas L3 en el caso de la línea control. El anticuerpo secundario que se utilizó en ambos casos estaba acoplado a FITC.

Las imágenes obtenidas a escala demostraban que los discos imaginales de ala de las larvas RNAi-B2 eran

claramente más pequeños que los de las larvas control. Además, en ellos se apreciaba mayor número de células apoptóticas. Estos resultados sugerían que los niveles de apoptosis se habían incrementado en los discos imaginales de ala como consecuencia de la interferencia del gen *d-mtTFB2*.

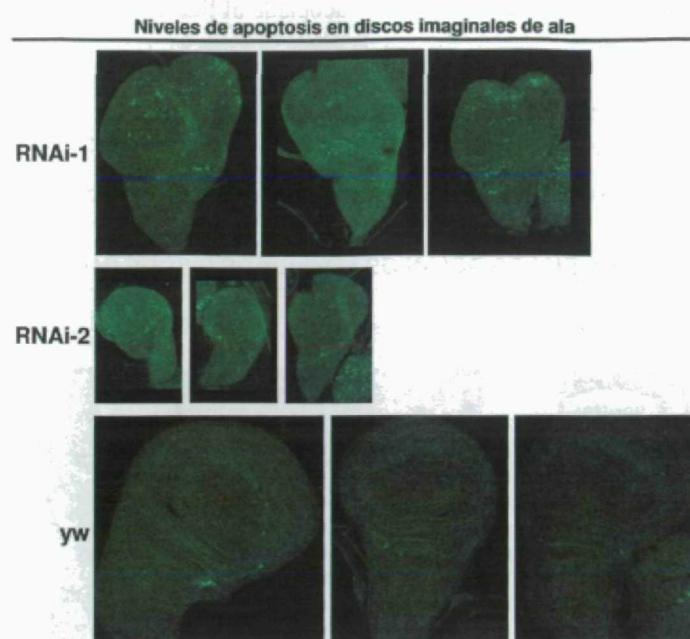


Figura 40. Niveles de apoptosis en discos imaginales de ala de larvas RNAi-B2. Los discos imaginales de ala se aislaron a partir de larvas interferidas de 15 días de edad y de larvas control L3. La detección de las células apoptóticas se realizó con un anticuerpo primario anti-caspasa3 obtenido en conejo y con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a FITC, que emite en verde. Las imágenes se captaron en un microscopio confocal.

Como resultaba difícil cuantificar los niveles de apoptosis en un disco de ala completo, decidimos reducir el territorio a analizar. Para ello indujimos la interferencia del gen *d-mtTFB2* con un “driver” GAL4 diferente. En lugar del daGAL4, empleamos el “driver” w;CyO/UASgfp,apGAL4 que iba a producir la RNAi según el patrón de expresión del gen *apterous* (*ap*), restringido a la parte dorsal del disco de ala. Además esta línea expresaba el gen testigo *gfp* en los mismos dominios en los que se iba a inducir la RNAi. Esta estrategia experimental presentaba la ventaja añadida de que el silenciamiento del gen *d-mtTFB2* ya no resultaba letal, lo cual permitía trabajar con discos imaginales de ala de tamaño normal en todos los casos.

CRUCE	DOMINIO NO-RNAi (#/cm ²)	DOMINIO RNAi (#/cm ²)	RELACIÓN NO-RNAi/RNAi
RNAi-B2 1	4,13	4,68	0,88
RNAi-B2 2	0,56	1,07	0,52
CONTROL	2,42	1,36	1,78
RNAi-B1 B	7,53	7,20	1,05
RNAi-B1 C	9,55	6,94	1,38
RNAi-B1 E	6,80	3,89	1,75

Tabla 6. Niveles de apoptosis inducidos por la RNAi de los genes *d-mtTFB2* y *d-mtTFB1* en discos imaginales de ala. El símbolo # representa número de células apoptóticas.

Para determinar los niveles de apoptosis producidos por la interferencia del gen *d-mtTFB2* se seleccionaron larvas L3 cuyo genotipo fuera w;UASgfp,apGAL4/+;UAS-IRB2/+. Como controles se utilizaron larvas en

las que se había interferido el gen *d-mtTFB1* de la misma manera y larvas *w;UASgfp,apGAL4/+;+/+*. Se aislaron los discos de ala y se realizó una triple tinción. Por una parte el dominio *apterous* en el que se expresaba la RNAi y el gen *gfp* se observaría en verde, por otra parte el patrón definido por el gen *wg* se visualizaría en azul empleando un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa 468 y por último las células apoptóticas se detectarían en rojo al utilizar un anticuerpo secundario acoplado a Rhodamine Red (Figura 41). Una vez obtenidas las imágenes de los discos de ala por microscopía confocal, con la ayuda de un programa informático de análisis de imágenes se cuantificó el número de células apoptóticas por cm^2 en las regiones dorsal y ventral de los mismos acotadas por el patrón de expresión del gen *wg* (Tabla 6).

NIVELES DE APOPTOSIS EN LOS DOMINIOS *apterous* DE DISCOS IMAGINALES DE ALA

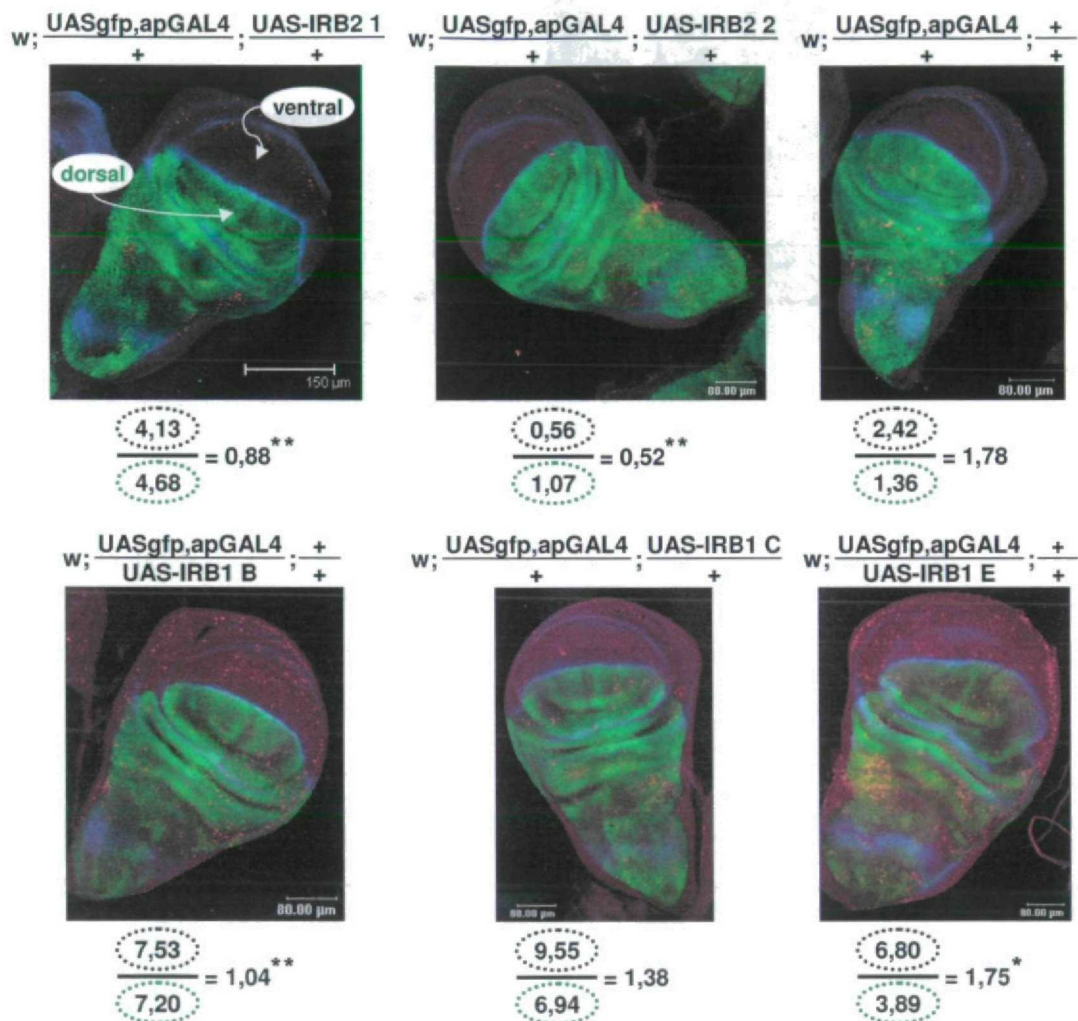


Figura 41. Cuantificación de los niveles de apoptosis en discos imaginales de ala que expresan la RNAi del gen *d-mtTFB2* en los dominios de expresión del gen *apterous*. Los discos imaginales se aislaron de larvas L3 de los genotipos indicados. En azul se observa el patrón de expresión del gen *wg*, en verde el dominio de expresión del gen *apterous* en el que se está produciendo la RNAi del gen *d-mtTFB2* y en rojo las células apoptóticas. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal y, utilizando un programa informático de análisis de imágenes, se cuantificaron las células apoptóticas en las regiones dorsal y ventral delimitadas por el patrón de expresión de *wg*. El nivel de apoptosis de cada genotipo se calculó como la relación entre el número de células apoptóticas por cm^2 en los dominios no-RNAi (ventral) y los dominios RNAi (dorsal) de los discos imaginales de ala. Los datos proceden del análisis de al menos cinco discos de ala de cada genotipo y la significación estadística de los resultados se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (* indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$).

Los resultados de este experimento confirmaban que se producía un incremento de la apoptosis en las regiones de los discos imaginales de ala en las que se estaba produciendo la interferencia del gen *d-mtTFB2*, lo cual se traducía en una disminución del cociente de células apoptóticas entre los dominios no-RNAi y RNAi. Este fenómeno no se observaba cuando el gen que se interfería era el *d-mtTFB1*, por lo que se trataba de una consecuencia específica de la interferencia del gen *d-mtTFB2*.

2.8. Análisis de los niveles de proliferación y crecimiento celular en las larvas RNAi-B2

Sabiendo que tanto las larvas RNAi-B2 como algunos de sus órganos presentaban un tamaño inferior al normal, nos planteamos determinar si la reducción de tamaño observada se debía a defectos en la proliferación o en el crecimiento celular.

2.8.1. Análisis de la proliferación celular en el sistema nervioso central de las larvas RNAi-B2

Para determinar si la proliferación celular se veía afectada por la RNAi del gen *d-mtTFB2*, analizamos la incorporación de bromodeoxiuridina en cerebros aislados de larvas RNAi-B2 8 días después de la puesta. Como controles se utilizaron cerebros de larvas de la misma edad de las líneas parentales UAS-IRB2 y daGAL4. La bromodeoxiuridina (BrdU) es un derivado de la uridina que puede ser incorporado al ADN en lugar de la timidina. Las células que proliferan han de duplicar su contenido génico antes de dividirse, por lo que la incorporación de BrdU es un indicativo de proliferación celular.

En las imágenes obtenidas a escala se observa que los cerebros de las larvas interferidas eran claramente más pequeños que los de las larvas control, especialmente los lóbulos ópticos, que constituían la región cerebral donde se observaba una mayor proliferación celular (Figura 42). A diferencia de las larvas control, los cerebros de las larvas RNAi-B2 no presentaban un patrón de tinción con BrdU punteado y específico como hubiera correspondido a un tejido en proliferación (Figura 43).

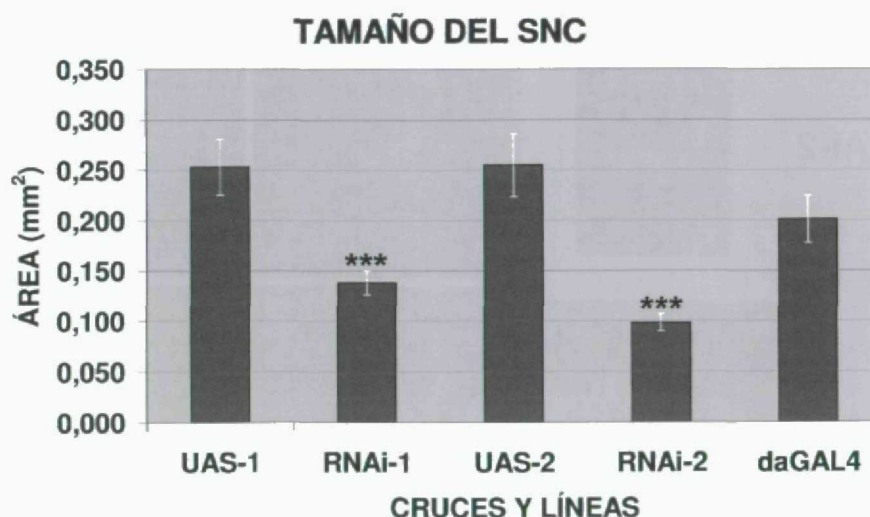


Figura 42. Tamaño del SNC de larvas RNAi-B2. El área media de los cerebros se calculó utilizando un programa informático de tratamiento de imágenes. Los datos proceden de cinco muestras independientes y la significación estadística de los resultados se calculó utilizando la prueba ONE-WAY ANOVA y el post-test de Bonferroni (***) indica $P < 0,001$.

Los resultados obtenidos demostraban que las larvas RNAi-B2 sufrían defectos a nivel de proliferación celular. Esto explicaba las diferencias de tamaño observadas entre los órganos de las larvas interferidas y de las larvas control, e incluso a nivel del animal entero.

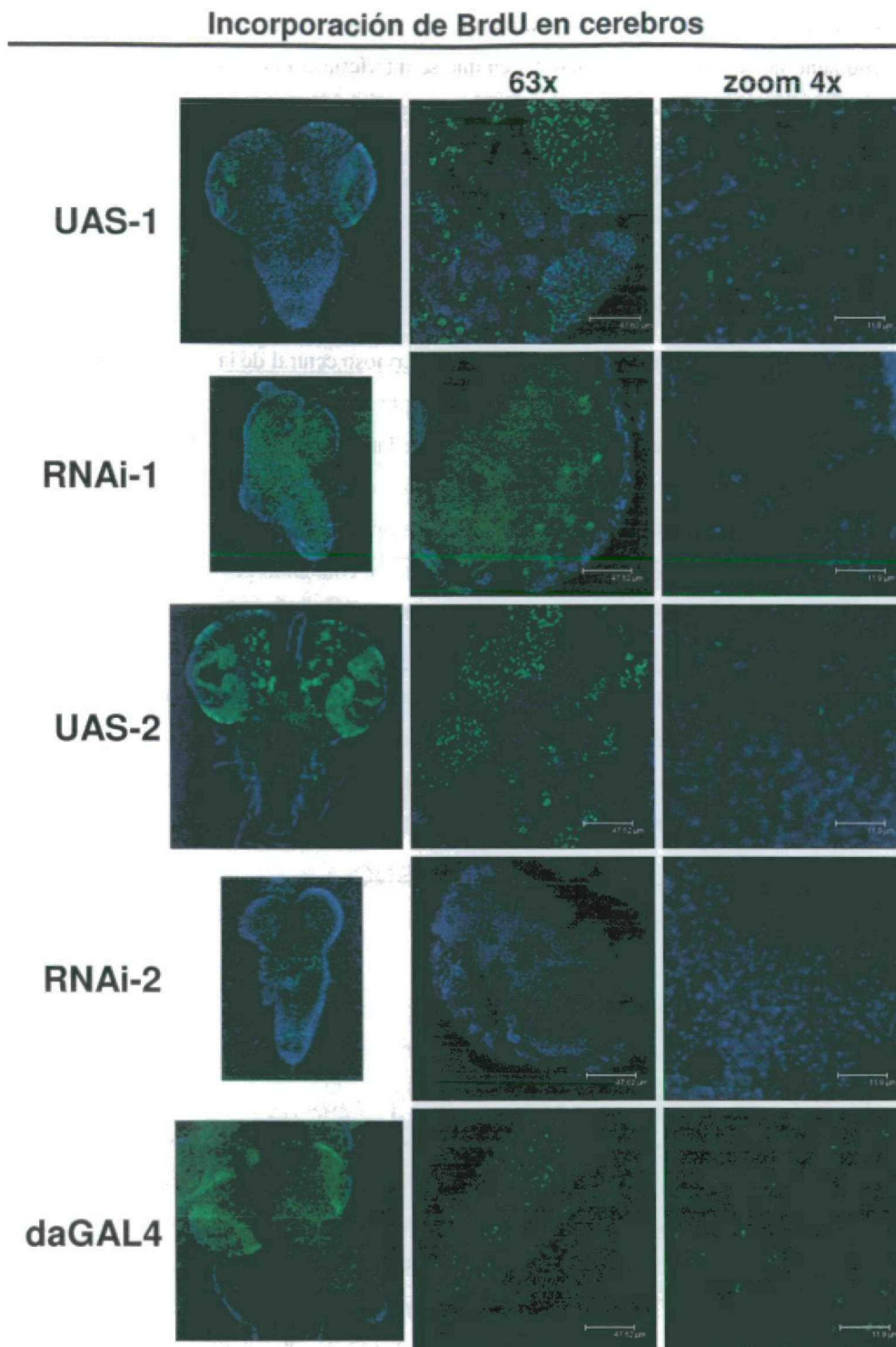


Figura 43. Análisis de la proliferación celular en cerebros de larvas RNAi-B2 mediante la incorporación de BrdU. Las imágenes muestran fotografías de microscopía confocal a distintos aumentos de los cerebros aislados a partir de larvas de los genotipos que se indican 8 días después de la puesta. Las células mitóticamente activas que incorporaron BrdU al replicar su ADN antes de dividirse muestran la fluorescencia verde del fluorocromo FITC asociado a la BrdU. En azul se visualizan los núcleos teñidos con DAPI. La interferencia del gen *d-mtTFB2* provocaba alteraciones en los centros de proliferación localizados en los lóbulos ópticos de los hemisferios cerebrales.

2.8.2. Análisis del tamaño celular y del número de células en las larvas RNAi-B2

Según los resultados del experimento de incorporación de BrdU, la interferencia del gen *d-mtTFB2* provocaba una menor proliferación celular. Cabía esperar que los órganos de las larvas RNAi-B2 contuvieran menor número de células que los de las larvas control. Para comprobar si esto era cierto, decidimos analizar los cerebros y los discos imaginales de ala de las larvas RNAi-2 por citometría de flujo. Además, esta estrategia experimental nos permitiría comparar el tamaño de las células presentes en los órganos de las larvas interferidas con respecto a las células de los órganos de las larvas control (Figura 44).

Se aislaron discos imaginales de ala y cerebros de larvas RNAi-2. Como controles se emplearon las líneas parentales UAS-2 y daGAL4. Los órganos aislados se incubaron con tripsina y Hoechst 33342 en agitación para disgregarlos completamente en las células que los constituían. El fluoróforo Hoechst 33342 permea en las células y se une específicamente al ADN para tefñirlas individualmente. Las muestras así obtenidas se analizaron en el citómetro.

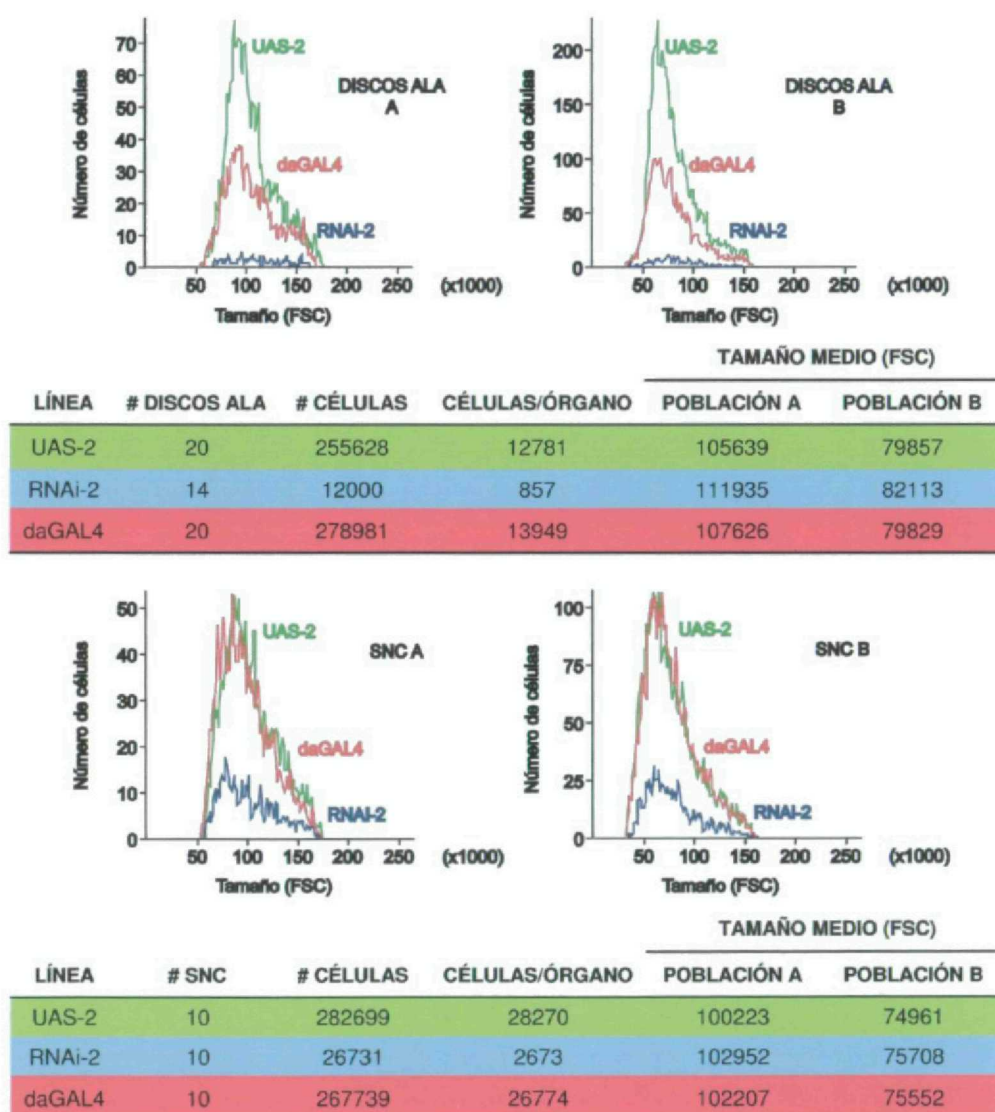


Figura 44. Análisis por citometría de flujo del tamaño celular y del número de células en órganos de larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2*. Se aislaron cerebros y discos imaginales de ala de larvas RNAi-2 y de las líneas parentales UAS-2 y daGAL4, que se utilizaron como controles. Por tratamiento con tripsina en agitación, estos órganos se disgregaron en las células que los integraban en presencia del fluoróforo Hoechst 33342. Las muestras se analizaron en el citómetro en función de su tamaño (FSC). La comparación de los valores FSC demostraba que el tamaño medio de las células RNAi-2 era similar al de las células control.

El análisis por citometría de flujo reflejaba que los órganos de las larvas interferidas, tanto los cerebros como los discos imaginales de ala, contenían menor número de células que los órganos de las larvas control. Sin embargo, no existían diferencias en cuanto al tamaño celular medio (FSC) de unos órganos con respecto a otros. Esto significaba que las larvas RNAi-2 sufrían defectos en la proliferación celular sin que ello afectara al tamaño de sus células. Por tanto, la interferencia del gen *d-mtTFB2* no tenía consecuencias en el crecimiento celular pero sí en la proliferación celular.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para la práctica totalidad de las células eucariotas. Sin embargo, el número de mitocondrias, la estructura y la función mitocondrial difieren sustancialmente de unas células a otras. El contenido mitocondrial y la capacidad respiratoria varían en función de la demanda energética y de las condiciones fisiológicas (Garesse and Vallejo 2001). Por ejemplo, en animales, las mitocondrias del tejido muscular proliferan en respuesta al ejercicio (Holloszy 1967) y a la estimulación eléctrica (Williams et al. 1987), las hormonas tiroideas incrementan los niveles de enzimas mitocondriales en múltiples tejidos (Pillar and Seitz 1997) y la cantidad de mitocondrias aumenta en el tejido adiposo marrón de ratón durante la termogénesis (Ricquier and Bouillaud 2000).

La biogénesis mitocondrial es un proceso que implica tanto la proliferación de nuevas mitocondrias como la maduración de las mitocondrias ya existentes. Dado el papel central de la mitocondria en la fisiología celular, la biogénesis mitocondrial está estrictamente controlada durante el desarrollo y la diferenciación celular (Fernandez-Moreno 2000). Cuando finaliza la diferenciación celular, cada célula contiene el número correcto de mitocondrias con la morfología adecuada y la distribución celular específica para satisfacer los diferentes requisitos de la función mitocondrial en los distintos tejidos del organismo (Enriquez et al. 1999; Lefai et al. 2000).

Las mitocondrias son estructuras únicas porque su actividad y, específicamente, su capacidad para generar ATP dependen de los dos sistemas genéticos presentes en la célula: el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. La capacidad codificante del ADNmt está limitada a 13 subunidades de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa y a los ARNr y ARNt necesarios para la síntesis de los mismos. Por tanto, las mitocondrias son orgánulos semiautónomos que dependen fuertemente del genoma nuclear para el ensamblaje del sistema OXPHOS y, en general, para su funcionalidad (Scarpulla 2002).

Puesto que la biogénesis mitocondrial es un proceso sujeto a un control genético dual, requiere por una parte la replicación y la expresión de los genes codificados en el genoma mitocondrial y, por otra, la expresión de más de 1000 genes codificados en el genoma nuclear. La expresión coordinada de ambos genomas resulta absolutamente necesaria para que la biogénesis mitocondrial se realice correctamente. Para ello existe un mecanismo de comunicación bidireccional entre los dos sistemas genéticos de la célula que están localizados en compartimentos subcelulares físicamente separados (Poyton and McEwen 1996). Pese a que la biogénesis mitocondrial es esencial para la vida de la célula, los circuitos regulatorios que controlan tanto la biogénesis como la función mitocondrial están aún mal caracterizados (Garesse and Vallejo 2001).

1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DEL ADNmt EN *Drosophila melanogaster*

Se ha descrito como una característica habitual de genes funcionamente relacionados la presencia de elementos comunes en cis- que regulan directamente la expresión coordinada de todos ellos (Halfon et al. 2002). Uno de los objetivos de esta tesis doctoral consistía en la identificación de algún elemento, ya descrito o no, que estuviera presente en las regiones promotoras de varios genes que codifican factores relacionados con el metabolismo del ADNmt en *Drosophila melanogaster* con objeto de identificar potenciales factores de transcripción implicados en la regulación de su expresión.

Para ello hemos seleccionado cuatro genes que han sido identificados muy recientemente y cuya función está mal caracterizada o, en algún caso, es desconocida: *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF*. En primer lugar, hemos demostrado la localización mitocondrial de las proteínas d-mtTFB1, d-mtTFB2 y d-mthelicasa mediante la generación de proteínas de fusión con GFP y su posterior expresión en células Schneider S2. Los resultados obtenidos confirman las predicciones proporcionadas por los programas informáticos MitoProtII y TargetP. La localización subcelular de estas proteínas de *Drosophila* concuerda con la observada en sus respectivos ortólogos humanos. TFB1M y TFB2M presentan un patrón de localización mitocondrial (Falkenberg et al. 2002) y Twinkle, la helicasa mitocondrial humana, colocaliza con el ADNmt en los nucleoides dentro de las mitocondrias de varias líneas celulares (Spelbrink et al. 2001). La proteína DmTTF, al igual que el resto de proteínas estudiadas en este trabajo, también está localizada en la mitocondria (Roberti et al. 2003).

1.1. Análisis de los promotores basales

Hemos determinado el sitio de inicio de transcripción de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2* y *d-mthelicasa* mediante la técnica 5'RLM-RACE. Los resultados revelan sitios de inicio de transcripción heterogéneos para todos ellos. Los sitios de inicio de transcripción del gen *d-mtTFB1* están localizados entre 507 y 495 pb 5' cadena arriba del codón ATG iniciador, lo cual significa que este gen contiene una región 5'UTR inusualmente larga. Esto mismo se ha observado en trabajos previos de nuestro laboratorio para el gen *d-polγ-β*, que codifica la subunidad accesoria de la ADN-polimerasa mitocondrial. En este caso, la región 5'UTR codifica otra proteína, d-gatC, que es esencial para el proceso de traducción mitocondrial y que está posiblemente implicada en la regulación del número de copias del ADNmt. La región 5'UTR del ARNm d-mtTFB1 contiene una pauta de lectura abierta de 87 aminoácidos que está conservada dentro del género *Drosophilidae* y en *A.gambiae*, pero no en otros organismos superiores. Los resultados obtenidos en los ensayos de transcripción transitoria revelan claramente que esta región ejerce un efecto potenciador sobre la actividad del promotor endógeno. Estos datos sugieren que, más que codificar un nuevo polipéptido funcional, la región 5'UTR de *d-mtTFB1* posiblemente esté implicada en la regulación de su expresión, quizás a nivel traduccional. Al contrario que *d-mtTFB1* y *d-polγ-β*, el gen *d-mthelicasa* contiene una región 5'UTR mínima puesto que la transcripción del mismo se inicia a tan sólo 16 pb del codón ATG iniciador. El gen *d-mtTFB2* es el que presenta mayor heterogeneidad en cuanto al inicio de la transcripción ya que los sitios obtenidos distan 30 pb entre sí.

El análisis *in silico* de los promotores basales de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, y *d-mthelicasa* ha revelado que estos genes carecen de cajas TATA en posiciones canónicas. Sin embargo, los resultados demuestran que los tres genes contienen elementos Inr y DPE en las posiciones esperadas. La ausencia de cajas TATA, los sitios de inicio de transcripción múltiples y la presencia de elementos Inr y DPE son características habituales de genes de expresión constitutiva y ya habían sido descritas para otros genes mitocondriales codificados en el núcleo (Pena et al. 1995; Ruiz de Mena et al. 1999). Los elementos Inr son importantes para la transcripción a partir de promotores sin cajas TATA (Cherbas and Cherbas 1993) y los elementos DPE son igualmente críticos para la función de estos promotores puesto que sirven de sitio de unión a factores de la maquinaria basal de transcripción como TFIID e interaccionan con proteínas TAFs tanto en *Drosophila* como en humanos (Arkhipova 1995; Burke and Kadonaga 1996).

1.2. Análisis de las regiones promotoras

Siguiendo la misma línea de otros trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio, hemos analizado las regiones promotoras de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF*. Para ello hemos llevado a cabo un estudio sistemático que comprendía, por una parte, la búsqueda *in silico* de posibles elementos reguladores y, por otra, un análisis funcional en células en cultivo. La actividad de distintos fragmentos de los promotores así como la funcionalidad de los elementos identificados en el análisis *in silico* se ha determinado con el uso de genes testigo mediante ensayos clásicos de delección, mutagénesis y transfección transitoria.

1.2.1. Factores de respiración nucleares NRF-1 y NRF-2

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en la caracterización de los factores que regulan la expresión de genes mitocondriales de mamíferos codificados en el núcleo. Estos estudios han comenzado a establecer la base molecular de la comunicación núcleo-mitocondria y de las cascadas de señalización que regulan la biogénesis mitocondrial y confieren características específicas de célula y tejido a cada mitocondria (Kelly and Scarpulla 2004).

Numerosas observaciones experimentales sugieren que, al menos en mamíferos, el control de la biogénesis mitocondrial está fuertemente regulado a nivel transcripcional (Goffart and Wiesner 2003) y se ejerce por una combinación de factores de transcripción nucleares generales o específicos, hormonas y coactivadores (Kelly and Scarpulla 2004). En humanos se ha identificado un nuevo circuito regulatorio integrado por los factores de respiración nucleares (NRFs) y una serie de coactivadores de la familia PGC-1 que constituye uno de los principales mecanismos de coordinación del proceso de biogénesis mitocondrial.

NRF-1 es un activador transcripcional que reconoce específicamente la secuencia palindrómica 5'-YGC GCAYGCGCR-3' a la que se une como homodímero (Scarpulla 1997). Este factor de transcripción regula la expresión de un gran número de genes que codifican subunidades de los distintos complejos OXPHOS y otros implicados en la expresión, ensamblaje y función de la cadena respiratoria. Además NRF-1 regula en humanos la expresión de genes de la maquinaria de transcripción del ADNmt: *Tfam*, *TFB1M*, *TFB2M* y *POLRMT* (Gleyzer et al. 2005). Se han identificado los ortólogos a NRF-1 en ratón, pollo, pez zebra, erizo de mar y *Drosophila* (DeSimone and White 1993). NRF-2 es otro factor de transcripción, relacionado con el anterior a través de su dominio de activación transcripcional, que reconoce secuencias que contienen el motivo GGAA característico de la familia de factores de transcripción con dominios ETS (Virbasius et al. 1993). Contiene cinco subunidades que forman heterotetrámeros que se unen cooperativamente a sitios de unión en tándem. Este factor de transcripción regula la expresión de genes humanos relacionados con la expresión del sistema OXPHOS incluidos los factores de transcripción mitocondriales *Tfam*, *TFB1M* y *TFB2M*. Los coactivadores de la familia PGC-1 integran la acción de NRF-1 y NRF-2 junto con la de otros factores de transcripción generales o específicos -Sp1, MEF-2, ERR- α - dentro del programa de biogénesis mitocondrial en respuesta a una gran variedad de señales fisiológicas como son el óxido nítrico, AMP cíclico, MAPK, calcineurina A y CaMK (Scarpulla 2002). PGC-1 α , PGC-1 β y PRC interaccionan con los NRFs y transactivan sus genes diana (Gleyzer et al. 2005). Por tanto, la integración de la expresión de los genes nucleares que codifican subunidades de los complejos OXPHOS con aquéllos que contribuyen a la replicación y transcripción del ADNmt resulta en la expresión bigenómica y coordinada del sistema OXPHOS (Scarpulla 2006).

Puesto que todos los genes sujetos a estudio en este trabajo eran firmes candidatos a participar en el proceso

de biogénesis mitocondrial, nos planteamos la posibilidad de que el mecanismo de regulación por NRFs y los coactivadores tipo PGC-1 estuviera también conservado en *Drosophila*. Trabajos previos habían demostrado que EWG, el ortólogo en *Drosophila* a NRF-1, era importante en el desarrollo de los sistemas nervioso y muscular, dos tejidos con alta demanda energética que requieren una mayor síntesis de complejos OXPHOS y una actividad mitocondrial elevada (DeSimone et al. 1996). El análisis sistemático de las regiones promotoras de varios genes mitocondriales relacionados con la biogénesis mitocondrial realizado por nuestro laboratorio había revelado la presencia de sitios NRF-1/EWG y/o NRF-2 en los promotores de los genes *d-mtSSB* (Ruiz de Mena et al. 2000), *d-δALAS* (Ruiz de Mena et al. 1999) y *d-βATPasa* (Ugalde et al. 2001). Sin embargo, hasta el momento no disponemos de ningún dato funcional de los mismos y, por tanto, no existen evidencias experimentales que apoyen la idea de que el mismo circuito genético identificado en mamíferos sea operativo en *Drosophila*.

En este trabajo hemos buscado *in silico* la presencia de sitios canónicos para NRF-1 y NRF-2 en las regiones promotoras de genes que forman parte de las maquinarias de replicación y transcripción del ADNmt en *Drosophila*. Aunque se han identificado sitios NRF-1 en los promotores de los genes *d-Tfam* y *d-mtTFB1*, el único localizado en una región promotora proximal corresponde al gen *d-polγ-α* y, en este caso, los datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que funciona como un represor, de un modo similar a lo descrito para el ortólogo en erizo de mar P3A2 (Calzone et al. 1991). Existen múltiples sitios para NRF-2 en la región 5' cadena arriba de todos los genes analizados, pero la mayoría se encuentran fuera de la región promotora proximal de 500 pb, que es el sitio donde se localizan principalmente los elementos funcionales en los genes de mamíferos. Por tanto, aunque no podemos descartar la participación de estos factores de transcripción en la expresión de alguno de estos genes, parece que en *Drosophila* la regulación de la biogénesis mitocondrial se ejerce fundamentalmente por otros factores distintos de los ortólogos a los factores humanos NRF-1 y NRF-2.

1.2.2. Elemento NRG

Recientemente se ha identificado mediante análisis *in silico* un nuevo elemento denominado NRG (Nuclear Respiratory Gene), cuya secuencia consenso es 5'-RTTAYRTAAY-3', que está presente en numerosos genes de *Drosophila* que codifican enzimas y factores del metabolismo energético (Sardiello et al. 2005). Si se demostrara su funcionalidad, este elemento podría ser clave en la coordinación intra- e intergenómica de los genomas nuclear y mitocondrial necesaria para expresar simultáneamente todos los genes cuya función está relacionada con el sistema OXPHOS y con el ciclo de Krebs.

Basándonos en este trabajo, hemos buscado la presencia de elementos NRG en los genes estudiados en esta tesis doctoral, preferentemente en las regiones 5'UTR e intrones puesto que es ahí donde se identificaron con mayor prevalencia estos sitios en el genoma de *Drosophila*. El gen *d-mtTFB1* contiene dos elementos NRG, uno en la región 5'UTR y otro en el primer intrón, cuyo grado de conservación en el genoma de *D.pseudoobscura* es del 80% y 55% respectivamente. No hemos encontrado sitios NRG ni en las regiones 5'UTR ni en los intrones de los genes *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF*. En consecuencia, tampoco parece que el elemento NRG juegue un papel importante en la expresión de estos genes, a excepción quizás de *d-mtTFB1*.

1.2.3. Sistema DRE/DREF

Los resultados del análisis *in silico* que realizamos antes de caracterizar funcionalmente las regiones promotoras sugerían que el sistema formado por el elemento DRE y el factor de transcripción que lo reconoce, DREF, podría ser un buen candidato para coordinar la expresión de los genes que codifican factores del metabolismo del ADNmt en *Drosophila*. Inicialmente se había descrito que el factor de transcripción DREF regulaba la expresión de genes de *Drosophila* implicados en la replicación del ADNn y en la progresión del ciclo celular como *ADNpol- α* , *PCNA* y *E2F* (Hirose et al. 1993; Hirose et al. 1996). Experimentos posteriores en células en cultivo han sugerido que DREF participa también en la expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Hochheimer et al. 2002). Además, según un estudio reciente parece que DREF está conservado evolutivamente ya que se ha identificado en humanos un gen que codifica una proteína potencialmente homóloga al factor DREF de *Drosophila* (Ohshima et al. 2003). Al igual que en *Drosophila*, se han encontrado elementos similares a DRE en las regiones promotoras de genes humanos implicados en proliferación celular y en la regulación del ciclo celular.

En nuestro grupo habíamos demostrado previamente que DREF regula la expresión de dos proteínas relacionadas con la replicación del ADNmt, mtSSB y pol γ - β (Lefai et al. 2000; Ruiz de Mena et al. 2000; Takata et al. 2001). El papel que DREF desempeña en la expresión de los genes *d-pol γ - β* , *d-mtSSB* y *d-Tfam* supone la primera evidencia experimental de la conexión existente entre la replicación del ADNn y del ADNmt durante el ciclo celular. DREF podría ser, por tanto, el responsable en *Drosophila* de coordinar la maquinaria de replicación del ADNmt con la síntesis del ADNn dependiente de ciclo celular. De ahí que hayamos decidido estudiar en detalle la función del sistema DRE/DREF en la expresión de los genes *d-mtTFB1*, *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF*.

Hemos realizado un análisis funcional de las regiones promotoras de estos cuatro genes mediante ensayos clásicos de transfección transitoria en células en cultivo y los resultados indican que la expresión de los genes *d-mtTFB2*, *d-mthelicasa* y *DmTTF* está regulada por DREF. En el caso del gen *d-mtTFB2* se ha delimitado una región promotora proximal de 50pb que conserva el 40% de la actividad del promotor de 2 kb. Este fragmento del promotor proximal contiene un elemento DRE que es reconocido por el factor DREF. En primer lugar, la mutagénesis dirigida del sitio DRE demuestra que este elemento es necesario para la actividad promotora. Por otra parte, los ensayos de retardo y súper-retardo en gel confirman que el factor DREF presente en extractos nucleares reconoce y se une al elemento DRE e indican que dicho reconocimiento es específico, pues los elementos DRE mutados no compiten eficientemente la formación del complejo DRE/DREF. Siguiendo una estrategia experimental similar, hemos localizado dos sitios DRE dobles funcionales en el promotor del gen *d-mthelicasa*: uno que se localiza sobre el inicio de transcripción y que sería reconocido por DREF dentro de la maquinaria basal de transcripción; y otro distante al que DREF se uniría como factor de transcripción clásico. El papel de DREF en el promotor del gen *d-mthelicasa* corrobora el perfil inusual descrito previamente acerca de este factor de transcripción (Hochheimer et al. 2002). DREF combina las características de un factor de transcripción clásico, en cuanto que reconoce secuencias específicas de la región promotora y se une a ellas estimulando la transcripción, con las de los componentes de la maquinaria basal de transcripción. DREF se asocia con un factor relacionado con la proteína TBP (TATA Binding Protein), denominado TRF-2 (TBP Related Factor 2), y forma parte del complejo de inicio de la transcripción para dotar de especificidad al conjunto en el reconocimiento del

promotor basal. En consonancia con el papel de DREF como regulador general de la transcripción, el análisis *in silico* de los promotores basales en el genoma de *Drosophila* ha identificado al elemento DRE en un elevado número de genes, aunque no se ha estudiado aún su posible funcionalidad (Ohler et al. 2002). El promotor del gen *DmTTF* es un caso excepcional, ya que presenta un polimorfismo que mapea sobre un sitio DRE doble localizado a 50pb del sitio de inicio de transcripción considerado como +1. Según los experimentos de transfección transitoria, la actividad de la versión del promotor que contiene un sitio DRE sencillo aparentemente no depende del sistema DRE/DREF mientras que la versión que contiene un sitio DRE doble sí estaría regulada por DREF. El análisis de la funcionalidad del sitio DRE doble en posición -50 junto con otro sitio DRE situado en posición -400 demuestra que ambos sitios son funcionales aunque no parece que actúen de forma sinérgica. Finalmente, y a diferencia de los anteriores, la expresión del gen *d-mtTFB1* no depende del sistema DRE/DREF ya que la delección del elemento DRE presente en posición -216 no provoca variaciones significativas en la actividad del promotor.

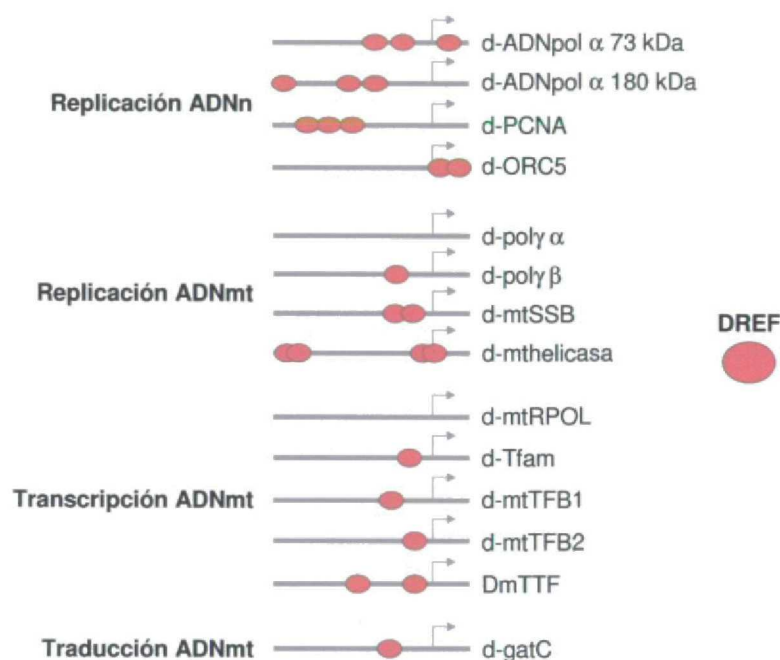


Figura 45. Localización esquemática de los sitios DRE analizados en las regiones promotoras de algunos genes implicados en el metabolismo del ADN en *Drosophila melanogaster*.

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que el sistema DRE/DREF podría ser relevante para la expresión *in vivo* de todos los genes estudiados, a excepción de *d-mtTFB1*. Teniendo en cuenta estos resultados y otros anteriores, DREF es un sólido candidato a participar en la coordinación de la expresión de la mayor parte de los genes que participan en la replicación, estabilización y transcripción del ADNmt en *Drosophila*: *poly- β* , *mtSSB*, *mthelicasa*, *Tfam*, *mtTFB2* y *DmTTF* (Figura 45). El hecho de que la expresión del gen *d-mtTFB1* no dependa de DREF podría significar que d-mtTFB1 no funciona en realidad como un factor de transcripción y, por tanto, que no está implicado en el metabolismo del genoma mitocondrial. Es interesante resaltar que los genes que codifican la subunidad catalítica de la poly y la ARN-polimerasa mitocondrial no contienen sitios DREF en sus regiones promotoras. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que estos genes se expresan a niveles bajos durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, los datos que disponemos de los genes que no catalizan las reacciones de polimerización, pero que

participan de un modo directo o indirecto en la replicación del ADNmt, sí están sometidos a una regulación más compleja. Por ejemplo, la expresión del gen *poly-β* tiene un pico de expresión que coincide con el reinicio de la replicación del ADNmt después de la gastrulación. Estos resultados sugieren que podrían ser los factores accesorios los que estuvieran implicados en la regulación de la replicación y transcripción del ADNmt. Aunque en la mayoría de los casos los sitios DRE están localizados en la región promotora proximal, en el promotor del gen *d-mthelicasa* existe un sitio DRE doble en posición -1860 que también parece ser funcional. Por tanto, el factor DREF puede regular la expresión de genes bien uniéndose a los elementos DRE más distales del promotor como un factor de transcripción clásico o bien formando parte de la maquinaria basal de transcripción en el caso de los sitios DRE proximales. Por otra parte, DREF es capaz de reconocer sitios DRE tanto si se encuentran como monómeros o como dímeros. Así, en la figura 45 puede observarse que DREF se une a los sitios DRE dobles presentes en los promotores de los genes *d-mtSSB* y *d-mthelicasa* pero que también lo hace a los sitios DRE sencillos que existen en el resto de promotores mostrados.

En conclusión, aunque la biogénesis mitocondrial no siempre esté acoplada al ciclo celular, el sistema DRE/DREF podría ser responsable de la expresión coordinada de varios genes que intervienen en estos procesos -cuando ambos han de producirse simultáneamente- y participaría así en la regulación de los mismos. Sin embargo, deben existir mecanismos de regulación adicionales que garanticen la expresión de los genes que integran la maquinaria de replicación del ADNmt cuando la biogénesis mitocondrial no está asociada al ciclo celular.

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES *d-mtTFB1* Y *d-mtTFB2*

En los últimos años se ha dedicado un notable esfuerzo al estudio de la replicación y la transcripción del ADNmt. Aunque estos procesos son inherentes a la biogénesis mitocondrial, todavía no se han identificado ni se han caracterizado todos los factores que intervienen en ellos. A excepción de los ARNr y los ARNt mitocondriales, el resto de los productos génicos implicados en el metabolismo del ADNmt están codificados en el genoma nuclear. Recientemente se ha reconstituido *in vitro* el replisoma mínimo necesario para la replicación del ADNmt en mamíferos (Korhonen et al. 2004) y se ha establecido un sistema de transcripción mitocondrial con proteínas recombinantes (Falkenberg et al. 2002). Considerando el modelo asimétrico/asincrónico, la replicación y la transcripción del ADNmt son procesos íntimamente relacionados, ya que los transcritos iniciados a partir del promotor de la cadena L generan los cebadores de ARN necesarios para el inicio de la replicación de la cadena H. Por tanto, todos los componentes de la maquinaria de transcripción mitocondrial están indirectamente relacionados con la síntesis del ADNmt. Esto implica que la integridad y el mantenimiento del número de copias del ADNmt, así como la actividad mitocondrial, depende de la funcionalidad de los genes que intervienen tanto en la replicación como en la transcripción del genoma mitocondrial.

En metazoos, la replicación y la transcripción del ADNmt se inician en la única región no codificante del genoma mitocondrial. El origen de replicación de la cadena H, O_H , y los promotores divergentes LSP y HSP se encuentran localizados en la región D-loop de vertebrados o, en su equivalente en invertebrados, la región de control (Shadel and Clayton 1997; Garesse and Kaguni 2005). Estos promotores comparten una región "enhancer" que contiene un sitio de unión para el factor de transcripción Tfam, al que esta proteína HMG

(High Mobility Group) se une específicamente para estimular la transcripción (Fisher and Clayton 1988). Además de T_{fam}, la transcripción del ADNmt en vertebrados requiere la presencia de la ARN-polimerasa mitocondrial y del factor de especificidad mtTFB (Bogenhagen 1996). En humanos se han identificado y clonado los genes que codifican la POLRMT y dos factores h-mtTFB, TFB1M y TFB2M (Falkenberg et al. 2002; McCulloch et al. 2002). En el sistema de transcripción *in vitro*, ambos factores son capaces de iniciar la transcripción específicamente a partir de los dos promotores mitocondriales en presencia de POLRMT y T_{fam}. Aunque originalmente se había descrito que el factor mtTFB de levaduras era similar a los factores sigma bacterianos (Jang and Jaehning 1991), más tarde se ha observado que tanto sc-mtTFB como los dos h-mtTFB están relacionados estructuralmente con las ARNr-metiltransferasas bacterianas (Schubot et al. 2001; Falkenberg et al. 2002). No obstante, TFB1M presenta mayor homología con esta familia de proteínas y se ha demostrado que puede unir S-adenosilmetionina y metilar ARNr (McCulloch et al. 2002; Seidel-Rogol et al. 2003), siendo esta actividad totalmente independiente de su capacidad para activar la transcripción (McCulloch and Shadel 2003). El factor de terminación de la transcripción en vertebrados mTERF está implicado en el control de la abundancia de los ARNr mitocondriales (Fernandez-Silva et al. 1997). Se acaba de demostrar que mTERF debe estar unido simultáneamente a los sitios de inicio y terminación de la transcripción de los ARNr en la misma molécula de ADNmt para promover el reciclaje de la maquinaria de transcripción y así satisfacer la mayor demanda de los ARNr frente al resto de ARN mitocondriales (Martin et al. 2005). A pesar del avance en el conocimiento del metabolismo del ADNmt obtenido con los sistemas *in vitro*, en mamíferos tan sólo se han realizado estudios *in vivo* de la función de T_{fam}. Esta proteína es muy abundante en la mitocondria y, además de su papel como factor de transcripción, se une inespecíficamente al ADNmt y lo empaqueta a modo de histona (Alam et al. 2003). Los ratones “knock-out” para T_{fam} muestran letalidad embrionaria y una depleción de ADNmt que confirma la función esencial de este factor en el mantenimiento del ADNmt (Larsson et al. 1998). La correlación existente entre los niveles de T_{fam} y el número de copias de la molécula de ADNmt también se ha observado en levaduras (Diffley and Stillman 1991), en pollo (Matsushima et al. 2003) y en *Drosophila* (Goto et al. 2001).

Al igual que en los vertebrados superiores, en *Drosophila* también se han identificado y clonado la mayor parte de los genes implicados en la replicación y transcripción del ADNmt. Mediante estudios genéticos en mutantes de *Drosophila* se ha establecido que tanto la subunidad catalítica α (Iyengar et al. 1999) como la subunidad accesoria β (Iyengar et al. 2002) de la ADN-polimerasa mitocondrial (poly) y la proteína mitocondrial de unión a ADN de cadena sencilla (Maier et al. 2001) son esenciales para el mantenimiento del ADNmt *in vivo*.

Al inicio de esta tesis doctoral, el conocimiento existente acerca de los factores de transcripción mitocondriales mtTFB1 y mtTFB2 en los distintos sistemas era muy limitado y se desconocía por completo la función específica de cada una de las dos proteínas. En este contexto, nuestro grupo inició una colaboración con el de la Dra. L.Kaguni para estudiar la función de estos factores *in vivo* utilizando tanto células en cultivo como moscas transgénicas. En cultivos celulares de *Drosophila*, el silenciamiento de la expresión del gen *d-mtTFB2* genera una disminución de los niveles de ARNm mitocondriales y una depleción del ADNmt, lo cual sugiere que esta proteína actúa como un factor de transcripción y que es importante para la síntesis del cebador en el proceso de replicación (Matsushima et al. 2004). Por el contrario, el silenciamiento de la expresión del gen *d-mtTFB1* no afecta a los niveles de ADNmt ni ARNm

mitocondriales y, sin embargo, disminuye moderada pero significativamente la biosíntesis de proteínas mitocondriales (Matsushima et al. 2005). En esta tesis doctoral hemos analizado la función de *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* mediante el silenciamiento de su expresión en moscas transgénicas utilizando la estrategia de interferencia de ARN (RNAi).

2.1. Estrategia experimental utilizada para generar fenotipos de pérdida de función

En este trabajo, hemos realizado el análisis funcional de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* interfiriendo su expresión *in vivo* a nivel de ARNm utilizando la estrategia de RNAi. Para ello se han utilizado las mismas construcciones que las descritas previamente para producir la RNAi de estos genes en células Schneider S2 (Matsushima et al. 2004; Matsushima et al. 2005). La transcripción de las repeticiones invertidas contenidas en dichas construcciones, y separadas por una región espaciadora, genera bucles de doble cadena de ARN que han sido definidos anteriormente como inactivadores eficientes de la función génica de interés mediante el mecanismo de RNAi (Kennerdell and Carthew 2000). Mientras que la interferencia de estos genes en células en cultivo se realizó mediante un sistema inducible por Cu^{+2} , al utilizar los animales hemos empleado el sistema UAS-GAL4 ya que se había observado que este sistema, en combinación con la tecnología de RNAi, constituye una potente herramienta para generar fenotipos de pérdida de función en *Drosophila* (Duffy 2002).

Debido a la naturaleza del fenómeno de RNAi, es poco probable que mediante esta estrategia se elimine por completo la expresión del gen interferido (Matzke et al. 2001). Seguramente los fenotipos de los mutantes nulos de cualquier gen son más severos que los fenotipos producidos por la RNAi del mismo. Sin embargo, ante la ausencia de mutantes, nulos o no, para los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2*, la estrategia de RNAi constituye una excelente herramienta para el estudio de la función de estos genes.

Por otra parte, una de las ventajas añadidas del sistema UAS-GAL4 junto con la estrategia de RNAi es que permite analizar la pérdida de la función del gen de interés en tejidos específicos. Así, hemos interferido la función del gen *d-mtTFB2* exclusivamente en sistema nervioso o en tejido muscular empleando los “drivers” GAL4 adecuados, además de en el organismo entero.

En este trabajo hemos utilizado el “driver” daGAL4 para inducir la interferencia generalizada de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* desde el inicio del desarrollo embrionario. Mientras que la RNAi de estos genes inducida por Cu^{+2} en células Schneider S2 provocaba una disminución de los niveles de proteína *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* del 95% (Matsushima et al. 2004; Matsushima et al. 2005), *in vivo* hemos logrado una interferencia máxima del 80% en los niveles de los ARNm correspondientes. En el caso de la RNAi del gen *d-mtTFB2*, la menor cantidad de ARNm correlaciona con una disminución de más del 50% en los niveles de proteína y este grado de interferencia es suficiente para provocar claramente un fenotipo de pérdida de función. Al interferir el gen *d-mtTFB1*, la reducción de los niveles de ARNm *d-mtTFB1* también está asociada a una caída similar en los niveles de proteína. Las diferencias observadas en células y en el animal entero en cuanto al grado de interferencia pueden explicarse por la propia naturaleza de cada uno de los sistemas, ya que en el cultivo celular todas las células disponen de Cu^{+2} para inducir la RNAi mientras que *in vivo*, debido a que no todas las células expresan el gen *daughterless* y a que el fenómeno de RNAi en *Drosophila* es no-sistémico (Van Roessel et al. 2002), pueden existir células que no estén expresando la RNAi.

2.2. RNAi *in vivo* del gen *d-mtTFB1*

En este trabajo hemos interferido gen *d-mtTFB1* de forma ubicua y temprana en el desarrollo de *Drosophila* y hemos demostrado que la reducción de los niveles de ARNm durante el 3^{er} estadio larvario en un 50-80% no tiene aparentemente ninguna consecuencia fenotípica. El desarrollo no sufre ninguna alteración, los adultos son fértiles y viables y no se detecta ninguna diferencia respecto a sus controles correspondientes. Los niveles de ARNm del gen *d-mtTFB2* no experimentan ninguna variación al interferir el gen *d-mtTFB1*, lo cual indica que no se está compensando su disminución con un aumento de la función de *d-mtTFB2*. Sin ser descartable que un mayor grado de inactivación del gen *d-mtTFB1* pudiera tener alguna consecuencia fenotípica, la comparación de los fenotipos producidos por un grado idéntico de interferencia a nivel de ARNm en las larvas RNAi-B1 y las RNAi-B2 indica que el gen *d-mtTFB2* es esencial para la vida de *Drosophila* mientras que el gen *d-mtTFB1* no. A pesar de que no se han analizado los niveles de ARNm mitocondriales ni la cantidad del ADNmt en las larvas y en los adultos de las líneas RNAi-B1, cabría esperar que los procesos de replicación y transcripción mitocondriales no se vieran afectados puesto que, de acuerdo con los resultados obtenidos en la RNAi del gen *d-mtTFB1* en células Schneider S2, la disminución total o parcial del factor *d-mtTFB1* no tiene ninguna repercusión sobre estos procesos (Matsushima et al. 2005). Por otra parte, será muy interesante analizar la traducción de los ARNm mitocondriales en las líneas RNAi-B1 para comprobar si también *in vivo* la deficiencia de *d-mtTFB1* afecta a la tasa de traducción mitocondrial. Los resultados del análisis funcional de *d-mtTFB1* en *Drosophila* concuerdan con las evidencias experimentales recientemente observadas para este mismo factor en mamíferos. Por una parte se ha descrito que, aunque TFB1M sea capaz de interaccionar con POLRMT y Tfam para activar la transcripción de forma específica a partir de los promotores mitocondriales *in vitro*, se trata de un factor de transcripción diez veces menos potente que TFB2M (Falkenberg et al. 2002). Por otra parte, TFB1M y el resto de sus ortólogos presentan mayor homología de secuencia con las ARNr-metiltransferasas bacterianas que el conjunto de *mtTFB2* y, además, TFB1M puede unir S-adenosilmetionina y metilar ARNr (Seidel-Rogol et al. 2003). Esto significa que TFB1M puede ejercer *in vitro* una función dual como factor de transcripción y como enzima modificadora de ARNr. Estos datos, junto con las observaciones de que en *Drosophila* la interferencia del gen *d-mtTFB1* no es letal y de que, al menos en células, sólo afecta a la traducción mitocondrial, sugieren que esta proteína no funcionaría *in vivo* como un factor de transcripción sino como un enzima implicado en la modificación de ARNr dispensable para la vida. En este sentido es interesante resaltar que recientemente se ha descrito que TFB1M actúa en humanos como un gen modificador de la expresión fenotípica de la sordera asociada a la mutación homoplásmica A1555G en el gen mitocondrial *12S ARNr* mediante la metilación de residuos de adenina próximos a esta mutación (Bykhovskaya et al. 2004). Por tanto, en determinadas situaciones, esta proteína puede resultar esencial para la correcta fisiología de la mitocondria. El sistema de interferencia de *d-mtTFB1* que hemos establecido en *Drosophila* puede resultar muy útil en el futuro para analizar la respuesta de la función mitocondrial en diversas situaciones de estrés.

2.3. RNAi *in vivo* del gen *d-mtTFB2*

Utilizando la misma estrategia que para *d-mtTFB1*, en este trabajo también hemos interferido el gen *d-mtTFB2* en *Drosophila* y hemos demostrado que la falta de función de *d-mtTFB2* provoca letalidad principalmente en el estadio larvario. En este caso la RNAi logra reducir los niveles de ARNm correspondientes al gen *d-mtTFB2* hasta un 25% del nivel normal en larvas de 3^{er} estadio, lo cual

correlaciona con una caída de más del 50% en los niveles de proteína. A diferencia de lo observado al interferir este gen en células Schneider S2 (Matsushima et al. 2004), la interferencia del gen *d-mtTFB2* *in vivo* está acompañada de un incremento significativo de la expresión del gen *d-mtTFB1*.

A nivel fenotípico hemos observado que las líneas RNAi-B2 son letales. Mientras que la letalidad embrionaria de la línea RNAi-1 es del 70%, en la línea RNAi-2 es únicamente del 10% y, por tanto, la práctica totalidad de los embriones alcanzan el estadio larvario. A excepción de un número muy reducido de “escapers” en la línea RNAi-1, en ambos casos las larvas interferidas que alcanzan el estadio LIII sufren una parada en el desarrollo y viven como tales hasta que mueren al cabo de un mes aproximadamente. A pesar de ser más pequeñas y tener menor masa que las larvas control, las larvas RNAi-B2 presentan las mandíbulas denticuladas y los espiráculos ramificados que son rasgos exclusivos de larvas de 3^{er} estadio.

Los defectos en el crecimiento y en la viabilidad ya se habían descrito como consecuencias fenotípicas características de alteraciones en la función de genes mitocondriales en distintos sistemas. Así, la RNAi de este mismo gen en células Schneider S2 provoca un enlentecimiento en el crecimiento las células interferidas y una menor viabilidad de las mismas (Matsushima et al. 2004). En *Drosophila* los mutantes en el gen *d-poly-α*, denominados *tamas* (Iyengar et al. 1999), y los mutantes *tko* y *bonsai*, que afectan a proteínas de los ribosomas mitocondriales (Toivonen et al. 2001; Galloni 2003), presentan defectos en el crecimiento. El mutante *tamas* y el mutante *lopo*, que elimina la función de la proteína d-mtSSB, son letales larvarios en el estadio LIII tardío mientras que el mutante en el gen *d-mtpoly-β* muere en pupa temprana. En otro sistema, los ratones “knock-out” para *Tfam* presentan un crecimiento retardado, una depleción del ADNmt y son letales en la etapa embrionaria (Larsson et al. 1998). En levaduras, la disrupción del gen *MTF-1* -ortólogo a *mtTFB*- provoca el fenotipo “petite” acompañado de una depleción del ADNmt (Shadel and Clayton 1995) y la disrupción del gen *ABF2* -ortólogo a *Tfam*- produce también una depleción del ADNmt asociada a una disminución de la actividad de la cadena respiratoria (Diffley and Stillman 1991). El conjunto de estas evidencias experimentales demuestra que los defectos génicos que afectan tanto al mantenimiento como a la expresión del ADNmt provocan graves consecuencias en la actividad mitocondrial, que se manifiestan como deficiencias en los procesos con mayor requerimiento energético -por ejemplo, el crecimiento- y que en la mayoría de las ocasiones son incompatibles con la vida.

Para comprobar si los efectos de la RNAi del gen *d-mtTFB2* en células y en el animal entero coincidían hemos medido los niveles de ADNmt y de varios ARNm mitocondriales. Hemos observado que los niveles de los mensajeros mitocondriales correspondientes a los genes *CytB* y *ND4* disminuyen progresivamente a medida que se prolonga el estadio larvario, lo cual demuestra que se trata de un factor esencial para el proceso de transcripción mitocondrial, cuya falta no puede ser compensada por d-mtTFB1. Sin embargo, no hemos detectado variaciones significativas en los niveles de ADNmt, aunque las larvas interferidas muestran una ligera tendencia a contener menos ADNmt que los controles. Estos resultados no coinciden con lo observado en células donde d-mtTFB2 es necesario tanto para la transcripción de los genes codificados en el genoma mitocondrial como para el mantenimiento del número de copias de la molécula de ADNmt (Matsushima et al. 2004). La discrepancia existente en cuanto al papel de d-mtTFB2 en la replicación del ADNmt puede deberse a que, a diferencia de las células de un organismo entero en el que unas se dividen y otras no, todas las células de un cultivo proliferan continuamente y, por eso, los defectos en la replicación del ADNmt se hacen más evidentes. Tampoco se puede descartar que los mecanismos de replicación que

mayoritariamente tengan lugar en células en cultivo y en el animal entero sean diferentes. Como hemos comentado previamente, existe actualmente una fuerte controversia centrada en el mecanismo de replicación del ADNmt, con dos modelos propuestos que poseen requerimientos diferentes. Otras observaciones obtenidas en nuestro grupo son también compatibles con la idea de que las condiciones de replicación del ADNmt en células en cultivo y en el animal entero son diferentes. La sobreexpresión en moscas transgénicas de la subunidad catalítica de la polγ provoca una fuerte depleción ya que interfiere con el proceso de replicación. Sin embargo, un nivel similar de sobreexpresión en células Schneider S2 no afecta a los niveles de ADNmt ni al crecimiento de las células (Lefai et al. 2000).

A nivel molecular hemos analizado por qRT-PCR los niveles de ARNm correspondientes a los genes *d-mtTFB2* y *d-mtTFB1* a lo largo del estadio larvario, que se ve prolongado extraordinariamente, en las larvas RNAi-B2. Hemos observado que durante toda la etapa larvaria los niveles de ARNm *d-mtTFB2* se encuentran por debajo del 50% del nivel normal en las dos líneas interferidas mientras que los niveles de ARNm *d-mtTFB1* se incrementan hasta alcanzar el doble del nivel normal y disminuyen posteriormente. Estos resultados sugieren que se trata de un efecto compensatorio y ponen en evidencia una clara comunicación retrógrada entre mitocondria y núcleo. Sin embargo, nuestros resultados indican fuertemente que el aumento en el nivel de *d-mtTFB1*, que hemos cuantificado tanto a nivel de ARNm como de proteína, no es capaz de compensar el defecto en transcripción provocado por la disminución de *d-mtTFB2*. Los resultados obtenidos al interferir *d-mtTFB1* en células Schneider S2 sugieren que se trata de una proteína reguladora del proceso de biosíntesis de proteínas mitocondriales y, por tanto, ésta podría ser la vía por la que intentara compensar el defecto mitocondrial (Matsushima et al. 2004). Por otro lado, los resultados obtenidos en la valoración de la actividad de la citrato sintasa son compatibles con un aumento en la masa mitocondrial de estas larvas, lo que sugiere una respuesta compensatoria más amplia.

Puesto que los genes codificados en el ADNmt codifican trece subunidades de los complejos OXPHOS I, III, IV y V, parecía lógico pensar que, si la RNAi del gen *d-mtTFB2* reducía la transcripción mitocondrial, necesariamente la actividad de los complejos de la cadena respiratoria que contienen subunidades codificadas en el ADNmt se iba a ver afectada. Hemos medido la actividad de los complejos OXPHOS en extractos mitocondriales de las larvas interferidas y hemos demostrado que la interferencia del gen *d-mtTFB2* reduce la actividad de los complejos I, III y IV a lo largo del período larvario mientras que incrementa la actividad del complejo II y del enzima citrato sintasa, codificados exclusivamente por genes nucleares, lo cual sugiere como se ha discutido previamente un aumento de masa mitocondrial. Estos resultados demuestran que las larvas RNAi-B2 presentan una capacidad respiratoria disminuida y, consecuentemente, las mitocondrias de estas larvas pierden progresivamente su capacidad de sintetizar ATP. Una deficiencia similar había sido previamente observada en los mutantes *lopo* cuyas larvas presentan una reducción drástica en los niveles de ADNmt y una disminución casi total del consumo de O₂, lo cual implica la pérdida de la capacidad de respiración (Maier et al. 2001).

A pesar de la severa disfunción mitocondrial que padecen, las larvas RNAi-B2 viven un tiempo inusualmente largo y, aunque son capaces de trepar por la pared del tubo en el que están contenidas en respuesta al calor, no abandonan la papilla en ningún momento. En consecuencia, parece que las larvas RNAi-B2 disponen de la energía suficiente para vivir como tales pero no para proseguir su desarrollo, que necesitan alimentarse continuamente para mantenerse con vida y que aparentemente no presentan defectos en su sistema locomotor,

lo cual se corrobora con la tinción del sistema muscular de estas larvas con X-gal.

Hemos medido la actividad del enzima PFK y la concentración de los metabolitos intermediarios y finales de la ruta glucolítica para comprobar si las larvas RNAi-B2 utilizan esta vía como alternativa a la fosforilación oxidativa para obtener energía. Aunque no se aprecian cambios en la actividad específica del enzima PFK medida en condiciones de $V_{m\acute{a}x}$, se observa una significativa acumulación de lactato. Estos resultados sugieren que la ruta glucolítica está activada y que todo el piruvato producido se convierte en lactato para regenerar NAD^+ y así garantizar el suministro de ATP vía glucolisis. Gracias a la activación de esta ruta, las larvas RNAi-B2 generan una cantidad de ATP compatible con la vida larvaria pero que depende del aporte calórico continuo. No obstante, los niveles de ATP totales en estas larvas son un 30% inferiores que los de las larvas control, lo cual significa que el balance energético no puede mantenerse exclusivamente a expensas de la glucolisis. Es probable que el déficit energético que presentan estas larvas sea el responsable último de la parada en el desarrollo, pero se desconocen cuáles son las causas que determinan la muerte de las larvas RNAi-B2 tras un mes de vida puesto que, teóricamente, podrían vivir indefinidamente siempre que dispusieran de alimento suficiente. Hemos observado que a partir del día 20 de vida, las larvas RNAi-B2 van disminuyendo progresivamente su movilidad, posiblemente como consecuencia de una interacción deficiente entre las fibras de actina y miosina del tejido muscular producida por la acidificación del pH al incrementarse la cantidad de lactato intracelular (Miyake et al. 2003). Creemos que esta acidificación del pH es uno de los posibles fenómenos desencadenantes de la letalidad tardía en la fase larvaria, ya que la viabilidad de las larvas RNAi-B2 depende de la generación de lactato de tal forma que las concentraciones intracelulares de este metabolito podrían alcanzar valores suficientes para provocar la muerte por acidosis láctica.

En los insectos holometábolos como *Drosophila* el inicio de la metamorfosis depende de la consecución del tamaño adecuado durante la fase larvaria y dicho tamaño se conoce como masa crítica (critical weight). La transición entre la fase larvaria y el período de pupación, que coincide con el comienzo de la metamorfosis, depende de los niveles de las hormonas JH, PTTH y ecdisona. Recientemente se ha descrito que en *Drosophila* el órgano sensor del tamaño es la glándula protorácica y que esta glándula depende de la insulina para determinar cuándo se ha alcanzado la masa crítica (Mirth et al. 2005). Las células que integran una larva presentan diferencias en términos de proliferación y crecimiento. Por una parte, las larvas contienen células diploides que se dividen continuamente y que forman parte de los discos imaginales que darán lugar al organismo adulto o imago; por otra, las larvas contienen células politenas que han sufrido ciclos de endorreplicación y que no se dividen, sólo crecen (Smith and Orr-Weaver 1991). Las larvas RNAi-B2 son claramente más pequeñas que las larvas control y probablemente detengan su desarrollo en la fase larvaria porque no sean capaces de alcanzar la masa crítica requerida para el inicio de la metamorfosis. Ni siquiera el aporte exógeno de ecdisona es capaz de promover la pupación de estas larvas, lo cual sugiere que la parada en el desarrollo no está producida por un defecto hormonal.

Para determinar cuál podía ser la conexión entre el defecto energético producido por la interferencia del gen *d-mtTFB2* y la parada en el desarrollo que sufren las larvas RNAi-B2, hemos analizado el grado de desarrollo y los niveles de apoptosis en algunos tejidos larvarios. La tinción histoquímica del sistema nervioso y del sistema muscular de las larvas RNAi-B2 muestra que ambos tejidos se han formado correctamente. El análisis de la expresión del gen *wingless* en los discos imaginales de ala revela que estos órganos son mucho más pequeños en las larvas RNAi-B2 que en las larvas control e indica que este gen se expresa en los

territorios adecuados aunque tarda más tiempo en definir su patrón espacial. Estos resultados indican que el desarrollo de las larvas interferidas se produce correctamente aunque a un ritmo más lento. La detección inmunocitoquímica de las células apoptóticas en los discos imaginales de ala demuestra que la interferencia del gen *d-mtTFB2* provoca un incremento específico en los niveles de apoptosis, que no se observa ni en las larvas control ni cuando el gen que se interfiere es *d-mtTFB1*, tanto si la interferencia se expresa de forma ubicua o exclusivamente en los dominios *apterous* del disco de ala. En los mutantes *lopo*, las células larvianas correspondientes al aparato digestivo, pero no las del sistema nervioso central, presentan también una mayor tasa de muerte celular programada (Maier et al. 2001).

El hecho de que las larvas RNAi-B2 sean más pequeñas que las larvas control puede deberse a defectos en el crecimiento o en la proliferación celular. Puesto que los tres mutantes de *Drosophila* que afectan a proteínas de la maquinaria de replicación del ADNmt presentan alteraciones en la proliferación celular y el mutante *tamas* presenta además un crecimiento celular defectivo (Iyengar et al. 1999; Maier et al. 2001; Iyengar et al. 2002), hemos considerado muy interesante analizar los efectos de la interferencia del gen *d-mtTFB2* sobre estos dos procesos. Los ensayos de incorporación de BrdU en el sistema nervioso central demuestran que los cerebros de las larvas RNAi-B2 son significativamente más pequeños que los de las larvas control y que presentan defectos generalizados en la proliferación celular. Por otra parte, el análisis por citometría de flujo de los cerebros y de los discos imaginales de ala revela que no existen variaciones entre las larvas RNAi-B2 y las larvas control en cuanto al tamaño medio de las células presentes en estos órganos, pero sí en cuanto al número de células que los constituyen. Basándonos en estos resultados, podemos afirmar que la reducción de tamaño observada tanto en el animal entero como en algunos de los órganos de las larvas RNAi-B2 se debe a defectos en la proliferación y no en el crecimiento celular.

Recientemente se ha identificado en el mutante *tenured* de *Drosophila* un mecanismo que podría explicar los defectos de proliferación observados en las larvas RNAi-B2 y en otros mutantes (Mandal et al. 2005). El mutante *tenured* presenta defectos en el gen nuclear que codifica la subunidad Va del complejo citocromo oxidasa (COX) y, al igual que las larvas RNAi-B2, interrumpen su desarrollo en el estadio LIII tardío. Estas larvas exhiben un fenotipo similar al producido por la interferencia del gen *d-mtTFB2*: caída de los niveles de ATP intracelular y crecimiento, diferenciación y morfogénesis normales. A diferencia de las larvas RNAi-B2, no muestran incrementos en los niveles de apoptosis. El mecanismo propuesto para justificar la interrupción del desarrollo se basa en la existencia de un punto de control del ciclo celular que se activa ante la falta de función mitocondrial. Las células detectarían la reducción de los niveles de ATP y, a través de la proteína pAMPK, activarían la proteína p53, lo cual dispararía un punto de control del ciclo celular mediado por ciclina E, que afectaría a la transición G1-S provocando la parada del ciclo celular. Dicha parada no tiene ningún efecto sobre la viabilidad ni sobre la diferenciación celular. Este mecanismo establece por primera vez una conexión molecular entre el defecto energético producido por una mutación en un gen mitocondrial con el fenotipo de parada en el desarrollo asociado a dicha mutación.

Aunque todavía existen numerosas cuestiones sin resolver acerca de los dos factores de transcripción mitocondriales tipo B, la interferencia de los genes *d-mtTFB1* y *d-mtTFB2* en *Drosophila* sugiere que estas proteínas no ejercen una función redundante *in vivo* en contra de lo establecido por los trabajos realizados *in vitro* con las proteínas homólogas de mamíferos. Resultaría muy interesante confirmar el papel del factor *d-mtTFB1* en la traducción mitocondrial, así como demostrar la implicación del punto de control del ciclo

celular mediado por ciclina E en la interrupción del desarrollo de las larvas RNAi-B2. Por otra parte, la interferencia simultánea de ambos genes debería aclarar definitivamente si estas proteínas son parcialmente redundantes, al menos en algunas situaciones fisiopatológicas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) El sistema DRE/DREF de *D.melanogaster* está implicado en la regulación de la expresión de los genes *d-mtTFB2* y *d-mthelicasa* pero no es relevante para la expresión del gen *d-mtTFB1*, al menos en células en cultivo. Estos resultados concuerdan con el papel del factor de transcripción DREF en la coordinación de la expresión de la mayoría de los genes implicados en la replicación del ADNmt con la expresión de genes que participan en la replicación del ADNn para integrar los procesos de biogénesis mitocondrial y proliferación celular.

2) Hemos identificado un polimorfismo en los elementos DRE presentes en el promotor proximal del gen *DmTTF* en distintas cepas y líneas de *D.melanogaster*. El sistema DRE/DREF es funcional en las versiones del promotor que contienen dos sitios DRE en tándem. Las versiones con un sitio DRE único no son transactivadas por este factor, al menos en células en cultivo.

3) El sistema DRE/DREF es funcional tanto si el elemento DRE está localizado en la región promotora proximal como si está presente en una región del promotor más distal. Los elementos DRE pueden ser reconocidos por el factor de transcripción DREF cuando se encuentran como monómeros o como dímeros.

4) El silenciamiento de la expresión del gen *d-mtTFB1* en *D.melanogaster* inducido temprano en el desarrollo y de forma ubicua en el organismo mediante RNAi no provoca ningún fenotipo evidente. Las moscas interferidas para el gen *d-mtTFB1* son viables, fértiles y no sufren ninguna alteración de comportamiento.

5) El silenciamiento de la expresión del gen *d-mtTFB2* en *D.melanogaster* inducido temprano en el desarrollo y de forma ubicua en el organismo mediante RNAi es letal en el estadio larvario. Las larvas interferidas para el gen *d-mtTFB2* sufren una parada en el estadio L3 y viven un tiempo anormalmente largo de aproximadamente 25 días. A nivel fenotípico, las larvas RNAi-B2 presentan menor tamaño y menor masa que las larvas control. La parada en el desarrollo no se revierte por el aporte exógeno de la hormona ecdisona que marca las transiciones entre los distintos estadios larvarios.

6) La disminución de los niveles de d-mtTFB2 reduce la transcripción del ADNmt pero no afecta a la cantidad de ADNmt, lo que demuestra por primera vez en un organismo que la proteína mtTFB2 es un factor de transcripción mitocondrial. En consecuencia, las larvas RNAi-B2 presentan un sistema OXPHOS deficiente y tienen menor capacidad mitocondrial de síntesis de ATP. Como efecto compensatorio, las larvas interferidas aumentan el flujo glucolítico para intentar mantener el balance energético y esto provoca una importante acumulación de lactato.

7) La reducción de los niveles de d-mtTFB2 provoca un aumento de la actividad del complejo II de la cadena respiratoria y de la actividad del enzima citrato sintasa, que son compatibles con un aumento de masa mitocondrial. La expresión del gen *d-mtTFB1* también aumenta significativamente, aunque no es capaz de compensar el defecto de transcripción provocado por la disminución de d-mtTFB2.

8) El defecto energético de las larvas RNAi-B2 no tiene ninguna consecuencia sobre la morfogénesis de los distintos órganos y tejidos. Sin embargo, sus órganos son claramente más pequeños que los de las larvas control. Ello es debido a un defecto en proliferación celular y no a una afectación del crecimiento de las células. Los discos imaginales interferidos expresan correctamente el gen marcador de desarrollo *wingless* aunque tardan más tiempo en definirlo y presentan un aumento en el nivel de apoptosis.

Conclusiones

9) El silenciamiento de la expresión del gen *d-mtTFB2* en el sistema nervioso de *D.melanogaster* es letal en pupa mientras que la interferencia del mismo gen en el tejido muscular es viable y no produce ningún fenotipo aparente.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, N., P. V. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, et al. (2003). "RNA interference: biology, mechanism, and applications." *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4): 657-85.
- Alam, T. I., T. Kanki, T. Muta, K. Ukaji, Y. Abe, et al. (2003). "Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM." *Nucleic Acids Res* 31(6): 1640-5.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* 290(5806): 457-65.
- Antoshechkin, I. and D. F. Bogenhagen (1995). "Distinct roles for two purified factors in transcription of *Xenopus* mitochondrial DNA." *Mol Cell Biol* 15(12): 7032-42.
- Antoshechkin, I., D. F. Bogenhagen and I. A. Mastrangelo (1997). "The HMG-box mitochondrial transcription factor xl-mtTFA binds DNA as a tetramer to activate bidirectional transcription." *Embo J* 16(11): 3198-206.
- Arco, A. and J. Satrustegui (2005). "New mitochondrial carriers: an overview." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 62(19 - 20): 2204-2227.
- Arkhipova, I. R. (1995). "Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis." *Genetics* 139(3): 1359-69.
- Ashburner, M., Golic, K.G. and Scott Hawley, R. (2005). *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bauer, M. (2002). Import of mitochondrial proteins. *Mitochondrial function and dysfunction*. A. H. Schapira. San Diego, Academic Press. 53.
- Biswas, G., O. A. Adebajo, B. D. Freedman, H. K. Anandatheerthavarada, C. Vijayasarathy, et al. (1999). "Retrograde Ca^{2+} signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk." *Embo J* 18(3): 522-33.
- Bodenstein, D. (1994). The postembryonic development of *Drosophila*. *Biology of Drosophila*. M. Demerec. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 275-367.
- Bogenhagen, D. F. (1996). "Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtDNA." *J Biol Chem* 271(20): 12036-41.
- Bogenhagen, D. F., Y. Wang, E. L. Shen and R. Kobayashi (2003). "Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes." *Mol Cell Proteomics* 2(11): 1205-16.
- Braidotti, G., I. Borthwick and B. May (1993). "Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic synthase from rat." *J. Biol. Chem.* 268(2): 1109-1117.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-15.
- Brown, T. A., C. Cecconi, A. N. Tkachuk, C. Bustamante and D. A. Clayton (2005). "Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism." *Genes Dev* 19(20): 2466-76.
- Burke, T. and J. Kadonaga (1996). "*Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters." *Genes Dev.* 10(6): 711-724.
- Bykhovskaya, Y., E. Mengesha, D. Wang, H. Yang, X. Estivill, et al. (2004). "Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation." *Mol Genet Metab* 82(1): 27-32.
- Calzone, F. J., C. Hoog, D. B. Teplow, A. E. Cutting, R. W. Zeller, et al. (1991). "Gene regulatory factors of the sea urchin embryo. I. Purification by affinity chromatography and cloning of P3A2, a novel DNA-binding protein." *Development* 112(1): 335-50.
- Champagne, A.-M., C. Dufresne, L. Viney and M. Gueride (1997). "Cloning, sequencing and expression of the two genes encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein in *Xenopus laevis*." *Gene* 184(1): 65-71.
- Chen, H. and D. C. Chan (2005). "Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission."

- Hum Mol Genet 14 Suppl 2: R283-9.
- Cherbas, L. and P. Cherbas (1993). "The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription." Insect Biochem Mol Biol 23(1): 81-90.
- Choi, T., N. Cho, Y. Oh, M. Yoo, A. Matsukage, et al. (2000). "The DNA replication-related element (DRE)-DRE-binding factor (DREF) system may be involved in the expression of the *Drosophila melanogaster* TBP gene." FEBS Lett 483(1): 71-7.
- Choi, Y. J., T. Y. Choi, M. Yamaguchi, A. Matsukage, Y. S. Kim, et al. (2004). "Transcriptional regulation of the *Drosophila* caudal homeobox gene by DRE/DREF." Nucleic Acids Res 32(12): 3734-42.
- Claros, M. G. and P. Vincens (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences." Eur J Biochem 241(3): 779-86.
- Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." Cell 28(4): 693-705.
- Clayton, D. A. (2000). "Vertebrate Mitochondrial DNA--A Circle of Surprises." Experimental Cell Research 255(1): 4-9.
- Clayton, D. A. (2003). "Mitochondrial DNA replication: what we know." IUBMB Life 55(4-5): 213-7.
- Cliften, P. F., J. Y. Park, B. P. Davis, S. H. Jang and J. A. Jaehning (1997). "Identification of three regions essential for interaction between a sigma-like factor and core RNA polymerase." Genes Dev 11(21): 2897-909.
- Cogoni, C. and G. Macino (2000). "Post-transcriptional gene silencing across kingdoms." Curr Opin Genet Dev 10(638-43).
- Currie, P. D. and D. T. Sullivan (1994). "Structure and expression of the gene encoding phosphofructokinase (PFK) in *Drosophila melanogaster*." J Biol Chem 269(40): 24679-87.
- de Bruijn, M. H. (1983). "*Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code." Nature 304(5923): 234-41.
- DeSimone, S., C. Coelho, S. Roy, K. VijayRaghavan and K. White (1996). "ERECT WING, the *Drosophila* member of a family of DNA binding proteins is required in imaginal myoblasts for flight muscle development." Development 122(1): 31-9.
- DeSimone, S. M. and K. White (1993). "The *Drosophila* erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein." Mol Cell Biol 13(6): 3641-9.
- Di Liegro, C. M., M. Bellafiore, J. M. Izquierdo, A. Rantanen and J. M. Cuezva (2000). "3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation." Biochem J 352 Pt 1: 109-15.
- Diffley, J. F. and B. Stillman (1991). "A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A 88(17): 7864-8.
- Dignam, J. D., R. M. Lebovitz and R. G. Roeder (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." Nucleic Acids Res 11(5): 1475-89.
- Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife." Genesis 34(1-2): 1-15.
- Echalier, G. (1997). Drosophila cells in culture. New York, Academic Press.
- Ekstrand, M. I., M. Falkenberg, A. Rantanen, C. B. Park, M. Gaspari, et al. (2004). "Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals." Hum Mol Genet 13(9): 935-44.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak and G. von Heijne (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol 300(4): 1005-16.
- Enriquez, J. A., P. Fernandez-Silva and J. Montoya (1999). "Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription." Biol Chem 380(7-8): 737-47.
- Evans, M. J. and R. C. Scarpulla (1989). "Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences." J Biol Chem 264(24): 14361-8.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, A. Rantanen, A. Trifunovic, N. G. Larsson, et al. (2002). "Mitochondrial

- transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." *Nat Genet* 31(3): 289-94.
- Farge, G., S. Touraille, P. Lachaume, R. Debie, V. Procaccio, et al. (2004). "Coordinated decrease of the expression of the mitochondrial and nuclear complex I genes in a mitochondrial mutant of *Drosophila*." *J Bioenerg Biomembr* 36(2): 203-10.
- Farr, C. L., Y. Wang and L. S. Kaguni (1999). "Functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis." *J Biol Chem* 274(21): 14779-85.
- Fazio, I. K., T. A. Bolger and G. Gill (2001). "Conserved regions of the *Drosophila* erect wing protein contribute both positively and negatively to transcriptional activity." *J Biol Chem* 276(22): 18710-6.
- Fernandez-Moreno, M. A., Ruiz de Mena, I. and Garesse, R. (2000). "Regulation of mitochondrial biogenesis during development and cell differentiation." *Current Topics in Biochemical Research* 2.
- Fernandez-Silva, P., F. Martinez-Azorin, V. Micol and G. Attardi (1997). "The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions." *The EMBO Journal* 16: 1066-1079.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391: 806-11.
- Fisher, R. P. and D. A. Clayton (1988). "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1." *Mol Cell Biol* 8(8): 3496-509.
- Freeman, M., A. Dobritsa, P. Gaines, W. Segraves and J. Carlson (1999). "The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*." *Development* 126(20): 4591-4602.
- Galloni, M. (2003). "Bonsai, a ribosomal protein S15 homolog, involved in gut mitochondrial activity and systemic growth." *Dev Biol* 264(2): 482-94.
- Garesse, R. (1988). "*Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations." *Genetics* 118(4): 649-63.
- Garesse, R. and L. S. Kaguni (2005). "A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation." *IUBMB Life* 57(8): 555-61.
- Garesse, R. and C. G. Vallejo (2001). "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes." *Gene* 263(1-2): 1-16.
- Gaspari, M., M. Falkenberg, N. G. Larsson and C. M. Gustafsson (2004). "The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells." *Embo J* 23(23): 4606-14.
- Gaspari, M., N.-G. Larsson and C. M. Gustafsson (2004). "The transcription machinery in mammalian mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1659(2-3): 148-152.
- Gaziova, I., P. C. Bonnette, V. C. Henrich and M. Jindra (2004). "Cell-autonomous roles of the ecdysoneless gene in *Drosophila* development and oogenesis." *Development* 131(11): 2715-25.
- Gleyzer, N., K. Vercauteren and R. C. Scarpulla (2005). "Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators." *Mol Cell Biol* 25(4): 1354-66.
- Goffart, S. and R. J. Wiesner (2003). "Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis." *Exp Physiol* 88(1): 33-40.
- Gonzalez-Mateos, F., M. Gomez, L. Garcia-Salguero, V. Sanchez and J. Aragon (1993). "Inhibition of glycolysis by amino acids in ascites tumor cells. Specificity and mechanism." *J. Biol. Chem.* 268(11): 7809-7817.
- Goto, A., Y. Matsushima, T. Kadowaki and Y. Kitagawa (2001). "*Drosophila* mitochondrial transcription factor A (d-TFAM) is dispensable for the transcription of mitochondrial DNA in Kc167 cells." *Biochem J* 354(Pt 2): 243-8.
- Halfon, M. S., Y. Grad, G. M. Church and A. M. Michelson (2002). "Computation-Based Discovery of Related Transcriptional Regulatory Modules and Motifs Using an Experimentally Validated Combinatorial Model." *Genome Res.* 12(7): 1019-1028.
- Hall, T. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for

- Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Heales, S. e. a. (2002). Oxidative phosphorylation: structure, function and intermediary metabolism. *Mitochondrial function and dysfunction*. A. H. Schapira. San Diego, Academic Press. 53.
- Hirose, F., M. Yamaguchi, H. Handa, Y. Inomata and A. Matsukage (1993). "Novel 8-base pair sequence (Drosophila DNA replication-related element) and specific binding factor involved in the expression of Drosophila genes for DNA polymerase alpha and proliferating cell nuclear antigen." *J Biol Chem* 268(3): 2092-9.
- Hirose, F., M. Yamaguchi, K. Kuroda, A. Omori, T. Hachiya, et al. (1996). "Isolation and characterization of cDNA for DREF, a promoter-activating factor for Drosophila DNA replication-related genes." *J Biol Chem* 271(7): 3930-7.
- Hochheimer, A., S. Zhou, S. Zheng, M. C. Holmes and R. Tjian (2002). "TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in Drosophila." *Nature* 420(6914): 439-45.
- Holloszy, J. O. (1967). "Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle." *J Biol Chem* 242(9): 2278-82.
- Holt, I. J., H. E. Lorimer and H. T. Jacobs (2000). "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA." *Cell* 100(5): 515-24.
- Hutchison, C. A., J. E. Newbold, S. S. POTTER and M. H. Edgell (1974). "Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA." 251(5475): 536-538.
- Iyengar, B., N. Luo, C. L. Farr, L. S. Kaguni and A. R. Campos (2002). "The accessory subunit of DNA polymerase gamma is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in Drosophila melanogaster." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4483-8.
- Iyengar, B., J. Roote and A. R. Campos (1999). "The tams gene, identified as a mutation that disrupts larval behavior in Drosophila melanogaster, codes for the mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit (DNApol-gamma125)." *Genetics* 153(4): 1809-24.
- Jang, S. H. and J. A. Jaehning (1991). "The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, MTF1, is similar to bacterial sigma factors." *J Biol Chem* 266(33): 22671-7.
- Janssen, G. and M. Bibb (1993). "Derivatives of pUC18 that have BglII sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of Escherichia coli colonies." *Gene* 124(1): 133-4.
- Jorgensen, R. A. (2003). Sense cosuppression in plants: Past, present and future. *RNAi: A guide to gene silencing*. G. J. Hannon. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 5-22.
- Kaguni, L. S. (2004). "DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase." *Annu Rev Biochem* 73: 293-320.
- Kelly, D. P. and R. C. Scarpulla (2004). "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function." *Genes Dev* 18(4): 357-68.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (2000). "Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA." *Nat Biotechnol* 18(8): 896-8.
- Korhonen, J. A., X. H. Pham, M. Pellegrini and M. Falkenberg (2004). "Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro." *Embo J* 23(12): 2423-9.
- Koyama, H., T. Kurokawa, T. Nonami, A. Nakao, S. Sugiyama, et al. (1998). "Increases in the Mitochondrial DNA Replication and Transcription in the Remnant Liver of Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243(3): 858-861.
- Kravchenko, J. E., I. B. Rogozin, E. V. Koonin and P. M. Chumakov (2005). "Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin." *Nature* 436(7051): 735-739.
- Lahaye, A., S. Leterme and F. Foury (1993). "PIF1 DNA helicase from Saccharomyces cerevisiae. Biochemical characterization of the enzyme." *J Biol Chem* 268(35): 26155-61.
- Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, et al. (1998). "Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice." *Nat Genet* 18(3): 231-6.
- Lefai, E., M. A. Fernandez-Moreno, A. Alahari, L. S. Kaguni and R. Garesse (2000). "Differential regulation

- of the catalytic and accessory subunit genes of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase." *J Biol Chem* 275(42): 33123-33.
- Lefai, E., M. A. Fernandez-Moreno, L. S. Kaguni and R. Garesse (2000). "The highly compact structure of the mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications." *Insect Mol Biol* 9(3): 315-22.
- Lewis, D. L., C. L. Farr and L. S. Kaguni (1995). "*Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons." *Insect Mol Biol* 4(4): 263-78.
- Lisowsky, T. and G. Michaelis (1988). "A nuclear gene essential for mitochondrial replication suppresses a defect of mitochondrial transcription in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* 214(2): 218-23.
- Macmillan, C., B. Lach and E. A. Shoubridge (1993). "Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA(Leu[3243])) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation." *Neurology* 43(8): 1586-90.
- Maier, D., C. L. Farr, B. Poeck, A. Alahari, M. Vogel, et al. (2001). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*." *Mol Biol Cell* 12(4): 821-30.
- Mandal, S., P. Guptan, E. Owusu-Ansah and U. Banerjee (2005). "Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*." *Dev Cell* 9(6): 843-54.
- Marco-Ferreres, R., J. Vivar, J. J. Arredondo, F. Portillo and M. Cervera (2005). "Co-operation between enhancers modulates quantitative expression from the *Drosophila* Paramyosin/miniparamyosin gene in different muscle types." *Mechanisms of Development* 122(5): 681-694.
- Margulis, L. (1975). "Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof." *Symp Soc Exp Biol* 29: 21-38.
- Martin, M., J. Cho, A. J. Cesare, J. D. Griffith and G. Attardi (2005). "Termination Factor-Mediated DNA Loop between Termination and Initiation Sites Drives Mitochondrial rRNA Synthesis." *Cell* 123(7): 1227-1240.
- Maruyama, K. and S. Sugano (1994). "Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides." *Gene* 138(1-2): 171-4.
- Matsushima, Y., C. Adan, R. Garesse and L. S. Kaguni (2005). "*Drosophila* mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells." *J Biol Chem* 280(17): 16815-20.
- Matsushima, Y., R. Garesse and L. S. Kaguni (2004). "*Drosophila* mitochondrial transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in schneider cells." *J Biol Chem* 279(26): 26900-5.
- Matsushima, Y., K. Matsumura, S. Ishii, H. Inagaki, T. Suzuki, et al. (2003). "Functional domains of chicken mitochondrial transcription factor A for the maintenance of mitochondrial DNA copy number in lymphoma cell line DT40." *J Biol Chem* 278(33): 31149-58.
- Matzke, M., A. J. Matzke and J. M. Kooter (2001). "RNA: guiding gene silencing." *Science* 293(5532): 1080-3.
- McCulloch, V., B. L. Seidel-Rogol and G. S. Shadel (2002). "A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine." *Mol Cell Biol* 22(4): 1116-25.
- McCulloch, V. and G. S. Shadel (2003). "Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity." *Mol Cell Biol* 23(16): 5816-24.
- Meeusen, S. L. and J. Nunnari (2005). "How mitochondria fuse." *Current Opinion in Cell Biology* 17(4): 389-394.
- Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." *Nature* 431: 343-349.
- Minczuk, M., J. Lilpop, J. Boros and P. P. Stepien (2005). "The 5' region of the human hSUV3 gene encoding mitochondrial DNA and RNA helicase: Promoter characterization and alternative pre-mRNA

- splicing." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1729(2): 81-87.
- Mirth, C., J. W. Truman and L. M. Riddiford (2005). "The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*." Curr Biol 15(20): 1796-807.
- Miyake, S., Y. Ishii, T. Watari, Z. Huang and T. Tsuchiya (2003). "The influences of L(+)-lactate and pH on contractile performance in rabbit glycerinated skeletal muscle." Jpn J Physiol 53(6): 401-9.
- Montoya, J., D. Ojala and G. Attardi (1981). "Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs." Nature 290(5806): 465-70.
- Moraes, C. e. a. (2002). Mitochondrial DNA structure and function. Mitochondrial function and dysfunction. A. H. Schapira. San Diego, Academic Press. 53.
- Morris, D. R. and A. P. Geballe (2000). "Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation." Mol Cell Biol 20(23): 8635-42.
- Neufeld, T. P., A. F. de la Cruz, L. A. Johnston and B. A. Edgar (1998). "Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing." Cell 93(7): 1183-93.
- Nisoli, E., E. Clementi, S. Moncada and M. O. Carruba (2004). "Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework." Biochem Pharmacol 67(1): 1-15.
- Nordeen, S. (1988). "Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers." Biotechniques 6(5): 454-8.
- Ohler, U., G. C. Liao, H. Niemann and G. M. Rubin (2002). "Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome." Genome Biol 3(12): RESEARCH0087. 1-12.
- Ohshima, N., M. Takahashi and F. Hirose (2003). "Identification of a human homologue of the DREF transcription factor with a potential role in regulation of the histone H1 gene." J Biol Chem 278(25): 22928-38.
- Park, S. Y., Y. S. Kim, D. J. Yang and M. A. Yoo (2004). "Transcriptional regulation of the *Drosophila* catalase gene by the DRE/DREF system." Nucleic Acids Res 32(4): 1318-24.
- Pena, P., C. Ugalde, M. Calleja and R. Garesse (1995). "Analysis of the mitochondrial ATP synthase beta-subunit gene in *Drosophilidae*: structure, transcriptional regulatory features and developmental pattern of expression in *Drosophila melanogaster*." Biochem J 312 (Pt 3): 887-97.
- Perez-Carreras, M., P. Del Hoyo, M. A. Martin, J. C. Rubio, A. Martin, et al. (2003). "Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology 38(4): 999-1007.
- Pillar, T. M. and H. J. Seitz (1997). "Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function." Eur J Endocrinol 136(3): 231-9.
- Poulton, J. and D. Marchington (2002). "Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications." Reproduction 123(6): 751-755.
- Poyton, R. O. and J. E. McEwen (1996). "Crosstalk Between Nuclear and Mitochondrial Genomes." Annual Review of Biochemistry 65(1): 563-607.
- Preston, C. M., M. C. Frame and M. E. Campbell (1988). "A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory DNA sequence." Cell 52(3): 425-34.
- Prieto-Martin, A., J. Montoya and F. Martinez-Azorin (2004). "New DNA-binding activity of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF)." J Biochem (Tokyo) 136(6): 825-30.
- Prieto-Martin, A., J. Montoya and F. Martinez-Azorin (2004). "Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA." Nucleic Acids Res 32(7): 2059-68.
- Rantanen, A., M. Gaspari, M. Falkenberg, C. M. Gustafsson and N.-G. Larsson (2003). "Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2." Mammalian Genome 14(1): 1-6.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance." J Physiol 529 Pt 1: 3-10.
- Riddiford, L. M. (1993). Hormones and *Drosophila* Development. The Development of *Drosophila melanogaster*. A. M. A. Michael Bate. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. II: 899-

- Roberti, M., P. L. Polosa, F. Bruni, C. Musicco, M. N. Gadaleta, et al. (2003). "DmTTF, a novel mitochondrial transcription termination factor that recognises two sequences of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA." *Nucleic Acids Res* 31(6): 1597-604.
- Rong, Y. S. and K. G. Golic (2001). "A Targeted Gene Knockout in *Drosophila*." *Genetics* 157(3): 1307-1312.
- Rong, Y. S., S. W. Titen, H. B. Xie, M. M. Golic, M. Bastiani, et al. (2002). "Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*." *Genes Dev.* 16(12): 1568-1581.
- Ruiz de Mena, I., M. A. Fernandez-Moreno, B. Bornstein, L. S. Kaguni and R. Garesse (1999). "Structure and regulated expression of the delta-aminolevulinic synthase gene from *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* 274(52): 37321-8.
- Ruiz de Mena, I., E. Lefai, R. Garesse and L. S. Kaguni (2000). "Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *Drosophila*." *J Biol Chem* 275(18): 13628-36.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardiello, M., G. Tripoli, A. Romito, C. Minervini, L. Viggiano, et al. (2005). "Energy biogenesis: one key for coordinating two genomes." *Trends Genet* 21(1): 12-6.
- Scarpulla, R. C. (1997). "Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells." *J Bioenerg Biomembr* 29(2): 109-19.
- Scarpulla, R. C. (2002). "Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2): 1-14.
- Scarpulla, R. C. (2006). "Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 97(4): 673-683.
- Schaefer, B. (1995). "Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends." *Analytical Biochemistry* 227(2): 255-273.
- Schapira, A. H. (1999). "Mitochondrial disorders." *Biochim Biophys Acta* 1410(2): 99-102.
- Scheffler, I. E. (1999). *Mitochondria*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Scheffler, I. E. (2001). "Mitochondria make a come back." *Adv Drug Deliv Rev* 49(1-2): 3-26.
- Schneider, W. C. and E. L. Kuff (1965). "The Isolation and Some Properties of Rat Liver Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid." *PNAS* 54(6): 1650-1658.
- Schneider, Y. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." *J Embryol Exp Morphol* 27: 353-365.
- Schubot, F. D., C. J. Chen, J. P. Rose, T. A. Dailey, H. A. Dailey, et al. (2001). "Crystal structure of the transcription factor sc-mtTFB offers insights into mitochondrial transcription." *Protein Sci* 10(10): 1980-8.
- Sedman, T., S. Kuusk, S. Kivi and J. Sedman (2000). "A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 20(5): 1816-24.
- Seidel-Rogol, B. L., V. McCulloch and G. S. Shadel (2003). "Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop." *Nat Genet* 33(1): 23-4.
- Shadel, G. S. (2004). "Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease." *Trends Genet* 20(10): 513-9.
- Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1995). "A *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial transcription factor, sc-mtTFB, shares features with sigma factors but is functionally distinct." *Mol Cell Biol* 15(4): 2101-8.
- Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1997). "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates." *Annu Rev Biochem* 66: 409-35.
- Smith, A. V. and T. L. Orr-Weaver (1991). "The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny." *Development* 112(4): 997-1008.
- Spelbrink, J. N., F. Y. Li, V. Tiranti, K. Nikali, Q. P. Yuan, et al. (2001). "Human mitochondrial DNA

- deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria." *Nat Genet* 28(3): 223-31.
- Spradling, A. C. and G. M. Rubin (1982). "Transposition of Cloned P Elements into Drosophila Germ Line Chromosomes." *Science* 218(4570): 341-347.
- Taanman, J. W. (1999). "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication." *Biochim Biophys Acta* 1410(2): 103-23.
- Takata, K., G. Ishikawa, F. Hirose and K. Sakaguchi (2002). "Drosophila damage-specific DNA-binding protein 1 (D-DDB1) is controlled by the DRE/DREF system." *Nucleic Acids Res* 30(17): 3795-808.
- Takata, K., H. Yoshida, F. Hirose, M. Yamaguchi, M. Kai, et al. (2001). "Drosophila mitochondrial transcription factor A: characterization of its cDNA and expression pattern during development." *Biochem Biophys Res Commun* 287(2): 474-83.
- Thummel, C. S. (2001). "Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*." *Dev Cell* 1(4): 453-65.
- Timmis, J. N., M. A. Ayliffe, C. Y. Huang and W. Martin (2004). "Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes." *Nat Rev Genet* 5(2): 123-35.
- Toivonen, J. M., K. M. O'Dell, N. Petit, S. C. Irvine, G. K. Knight, et al. (2001). "Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness." *Genetics* 159(1): 241-54.
- Tomari, Y. and P. D. Zamore (2005). "Perspective: machines for RNAi." *Genes Dev* 19(5): 517-29.
- Tomecki, R., A. Dmochowska, K. Gewartowski, A. Dziembowski and P. P. Stepień (2004). "Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase." *Nucl. Acids Res.* 32(20): 6001-6014.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J. N. Spelbrink, A. T. Rovio, et al. (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature* 429(6990): 417-423.
- Truman, J. W. and M. Bate (1988). "Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* 125(1): 145-57.
- Ugalde, C., P. Ochoa, M. L. Perez, M. A. Fernandez-Moreno, M. Calleja, et al. (2001). "Identification of a proximal promoter region critical for the expression of the beta-F1-ATPase gene during *Drosophila melanogaster* development." *Mitochondrion* 1(3): 225-36.
- Van Roessel, P., N. M. Hayward, C. S. Barros and A. H. Brand (2002). "Two-color GFP imaging demonstrates cell-autonomy of GAL4-driven RNA interference in *Drosophila*." *Genesis* 34(1-2): 170-3.
- Venken, K. J. and H. J. Bellen (2005). "Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*." *Nat Rev Genet* 6(3): 167-78.
- Virbasius, J. V. and R. C. Scarpulla (1994). "Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4): 1309-13.
- Virbasius, J. V., C. A. Virbasius and R. C. Scarpulla (1993). "Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters." *Genes Dev* 7(3): 380-92.
- Wibom, R., K. Soderlund, A. Lundin and E. Hultman (1991). "A luminometric method for the determination of ATP and phosphocreatine in single human skeletal muscle fibres." *J Biolumin Chemilumin* 6(2): 123-9.
- Williams, R. S., M. Garcia-Moll, J. Mellor, S. Salmons and W. Harlan (1987). "Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression nuclear genes encoding mitochondrial proteins." *J Biol Chem* 262(6): 2764-7.
- Xu, B. and D. A. Clayton (1992). "Assignment of a yeast protein necessary for mitochondrial transcription initiation." *Nucleic Acids Res* 20(5): 1053-9.
- Yakubovskaya, E., Z. Chen, J. A. Carrodegua, C. Kisker and D. F. Bogenhagen (2005). "Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer." *J. Biol. Chem.*: M509730200.
- Yamaguchi, M., Y. Hayashi, Y. Nishimoto, F. Hirose and A. Matsukage (1995). "A nucleotide sequence essential for the function of DRE, a common promoter element for *Drosophila* DNA replication-related genes." *J Biol Chem* 270(26): 15808-14.

- Yang, M. Y., M. Bowmaker, A. Reyes, L. Vergani, P. Angeli, et al. (2002). "Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication." Cell 111(4): 495-505.
- Yoshida, H., E. Kwon, F. Hirose, K. Otsuki, M. Yamada, et al. (2004). "DREF is required for EGFR signalling during Drosophila wing vein development." Genes Cells 9(10): 935-44.

ANEXOS

Drosophila Mitochondrial Transcription Factor B1 Modulates Mitochondrial Translation but Not Transcription or DNA Copy Number in Schneider Cells*

Received for publication, January 18, 2005, and in revised form, March 1, 2005
Published, JBC Papers in Press, March 3, 2005, DOI 10.1074/jbc.M500569200

Yuichi Matsushima[‡], Cristina Adán[§], Rafael Garesse[§], and Laurie S. Kaguni^{‡¶}

From the [‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824-1319 and [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, c/Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

We report the cloning and molecular analysis of *Drosophila* mitochondrial transcription factor (*d*-mtTF) B1. An RNA interference (RNAi) construct was designed that reduces expression of *d*-mtTFB1 to 5% of its normal level in Schneider cells. In striking contrast with our previous study on *d*-mtTFB2, we found that RNAi knockdown of *d*-mtTFB1 does not change the abundance of specific mitochondrial RNA transcripts, nor does it affect the copy number of mitochondrial DNA. In a corollary manner, overexpression of *d*-mtTFB1 did not increase either the abundance of mitochondrial RNA transcripts or mitochondrial DNA copy number. Our data suggest that, unlike *d*-mtTFB2, *d*-mtTFB1 does not have a critical role in either transcription or regulation of the copy number of mitochondrial DNA. Instead, because we found that RNAi knockdown of *d*-mtTFB1 reduces mitochondrial protein synthesis, we propose that it serves its primary role in modulating translation. Our work represents the first study to document the role of mtTFB1 *in vivo* and establishes clearly functional differences between mtTFB1 and mtTFB2.

Mitochondrial number and DNA content vary widely depending on cellular energy requirements, which are met in large part by ATP production by the oxidative phosphorylation pathway. Expression of the 13 polypeptides involved in oxidative phosphorylation that are encoded in the mtDNA¹ genome is essential for this process. Transcription in animal mitochondria is thought to involve mitochondrial RNA polymerase and three distinct transcription factors (1, 2). Mitochondrial transcription factor A (formerly referred to as mtTFA) contains two HMG boxes and was shown in *organello* to bind nonspecifically at regularly phased intervals to the control region of human mtDNA (3) and to package mtDNA in nucleoids (4, 5). Human

mitochondrial transcription factor A was also shown to be required for specific initiation at mitochondrial promoters *in vitro* (6–9). Two additional human transcription factors, mtTFB1/TFB1M and mtTFB2/TFB2M, have also been shown to activate transcription from mitochondrial promoters in the presence of mitochondrial transcription factor A and mitochondrial RNA polymerase *in vitro*, and *h*-mtTFB2 is more active in promoting transcription than *h*-mtTFB1 (6, 10). Recent studies show that *h*-mtTFB1 has rRNA adenine dimethyltransferase activity when expressed in bacteria (11) and that its *in vitro* transcriptional activation and methylase activities can be inactivated differentially by mutation (12).

Although *in vitro* studies show that both mtTFB1 and mtTFB2 support transcription from human mitochondrial promoters (6), their relative importance and specific physiological roles are not well understood. In a recent study (13), we showed that RNAi knockdown of *d*-mtTFB2 reduces the abundance of specific mitochondrial RNA transcripts and decreases the copy number of mtDNA in *Drosophila* cultured cells. This finding suggests that endogenous *d*-mtTFB1 cannot complement a deficiency in *d*-mtTFB2 and thus is not functionally redundant with *d*-mtTFB2, pointing to specialized roles for the two transcription factors *in vivo*. Here, we report the cloning and overexpression of *Drosophila* mtTFB1 and the knockdown phenotype of *Drosophila* Schneider cells treated with *d*-mtTFB1-targeted RNAi. Our results do not support an important role for mtTFB1 in either efficient mitochondrial transcription or maintenance of mtDNA. Rather, we found that mtTFB1 modulates mitochondrial translation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Identification and Sequence Analysis of *d*-mtTFB1 cDNA—The amino acid sequence of *d*-mtTFB1 was used to search the Berkeley *Drosophila* Genome Project Data Base. One sequence (CG7319) was identified that has a high level of homology to *d*-mtTFB1. Full-length cDNA was prepared using the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech), total RNA from *Drosophila* Schneider S2 cells, and the following primers; 5'-TTACCCCACTTGCTACTCTGGTGG-3' and 5'-GGGCTCGAGGCACCTTGGCTATGAATTTGTGCTC-3' for 5'-RACE, and 5'-CAAAATGGACGGTGGTTCCAGG-3' and 5'-GGGGAATTCCTCAAGCACITGATCAACTCC-3' for 3'-RACE. RACE products were purified from an agarose gel and sequenced, and sequence analysis was performed using MacDNASIS version 3.7 (Hitachi Software). Similarity searches against the non-redundant GenBankTM data base were performed using BLAST (14). The deduced amino acid sequence was checked for targeting signal peptides using iPSORT (15) and MITPROT (16). Multiple sequence alignments were performed with ClustalW (17).

Bacterial Overexpression of *d*-mtTFB1 and Preparation of *d*-mtTFB1 Antibody—To express *d*-mtTFB1 in *Escherichia coli*, a PCR fragment of *d*-mtTFB1 cDNA encoding amino acid residues Gly-12 to Leu-330 was cloned into pET-28a (Novagen) cleaved with EcoRI and XhoI. Bacterial cells harboring the plasmid were grown in LB medium containing 100

* This work was supported by National Institutes of Health Grant GM45295 (to L. S. K.) and Grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain BMC01-1525 and Instituto de Salud Carlos III, Redes de centros RCMN (C03/08) and Temáticas (G30/011) (to R. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 517-353-6703; Fax: 517-353-9334; E-mail: lskaguni@msu.edu.

¹ The abbreviations used are: mtDNA, mitochondrial DNA; *d*-mtTF, *Drosophila* mitochondrial transcription factor; *h*-mtTF, human mitochondrial transcription factor; *sc*-mtTF, *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial transcription factor; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RNAi, RNA interference; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; TBE, Tris borate-EDTA; SSPE, saline/sodium phosphate/EDTA; S-AdoMet, S-adenosyl-L-methionine.

$\mu\text{g/ml}$ kanamycin, and expression was induced with 1 mM isopropylthiogalactoside. The C-terminal His₆ tag was utilized for nickel-nitrilotriacetic acid affinity purification of recombinant *d-mtTFB1* according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Rabbits were immunized by injection of column-purified *d-mtTFB1* in Freund's complete adjuvant, followed by secondary immunization in Freund's incomplete adjuvant. To prepare affinity-purified antiserum, purified *d-mtTFB1* (100 μg) was bound to a polyvinylidene difluoride membrane, and the filter was preincubated for 1 h with 5% skim milk in PBS, incubated for 1 h with crude antiserum (1 ml in 5 ml of PBS containing 0.1% Tween 20), washed four times with PBS containing 0.1% Tween 20, and eluted with 0.2 M glycine-HCl (pH 2.4) (~5 ml). The eluted antibody was neutralized with 1 M Tris base.

Preparation of Inducible Plasmids Expressing *d-mtTFB1* and *d-mtTFB1*-targeted RNAi—The plasmid pMt/B1/Hy, in which *d-mtTFB1* cDNA is regulated by the metallothionein promoter, was constructed as follows: a fragment of *d-mtTFB1* cDNA was amplified by PCR using 5'-GGGCTCGAGGAAGTCGTTGCACAACAG-3' as 5'-primer and 5'-GCGCACTAGTCAGGAGTGAATCGTTGC-3' as 3'-primer. The PCR fragment was cleaved by XhoI and SpeI and subcloned. The plasmid pMt/invB1/Hy carries an inverted repeat of a nucleotide sequence from *d-mtTFB1* cDNA that is transcribed from the metallothionein promoter. The insert in pMt/invB1/Hy was generated from two PCR-amplified fragments of *d-mtTFB1* cDNA. One fragment has terminal XhoI and EcoRI sites and was prepared using the following pair of primers: 5'-CGCCTCGAGACTAGTACGGACAAGATAGTCAAGTCG-3' (forward) and 5'-CGCGAATTCGGGATCGATTAGCTTCTCAGCAACCTCCTC-3' (reverse). A second fragment has terminal SpeI and EcoRI sites and was prepared using the primers 5'-CGCCTCGAGACTAGTACGGACAAGATAGTCAAGTCG-3' (forward) and 5'-CGCGAATTCAAAAAGCTTTAGCTTCTCAGCAACCTCCTC-3' (reverse). The two PCR products were ligated and cloned into the pMt/Hy vector cleaved with XhoI and SpeI.

Generation and Induction of Stable Cell Lines—*Drosophila* Schneider S2 cells were cultured at 25 °C in *Drosophila* Schneider Medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were subcultured to 3×10^6 cells/ml every third day. Cells were transfected using Effectene (Qiagen). Hygromycin-resistant cells were selected with 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hygromycin. Cells were passaged at least five times in hygromycin-containing medium and then cultured in standard medium. The cell lines were grown to a density of 3×10^6 cells/ml and then treated with 0.4 mM CuSO₄ to induce high level expression from the metallothionein promoter (18). Overexpression of *d-mtTFB1* was effected by growth of the cell culture in the presence of 0.05, 0.1, and 0.4 mM CuSO₄.

Analysis of Mitochondrial Protein Synthesis—Cell lines were grown in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄ for 10 days. Cells were harvested at room temperature, washed twice with methionine-free Grace's insect culture medium (Invitrogen), and resuspended at 3×10^6 cells/ml in methionine-free Grace's insect culture medium supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ emetine, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide. Five minutes after cell resuspension, ³⁵S-Trans-label (ICN) was added to 300 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, and the cells were incubated for 2 h at 25 °C. After incubation, the cells were diluted with 2 volumes of Schneider Medium and then washed twice with PBS. The cells were lysed in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 1% SDS. Total cellular protein (30 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was fractionated by 15–20% gradient SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and dried. The gels were autoradiographed by exposure to x-ray film (Kodak) for 3–10 days; the mitochondrial polypeptides indicated at right in Fig. 5 were quantitated from two independent experiments using the Kodak 1D program software.

RT-PCR Analysis—RT-PCRs were performed to determine mtTFB1 mRNA levels in Schneider cells. Reactions contained 5 μg of total RNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 2.5 mM MgCl₂, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine serum albumin, 1 mM deoxynucleotide triphosphates, and 20 units of RNasin (Promega) in a total volume of 50 μl . First-strand cDNA was synthesized using 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) with 20 pmol of (dN)₆ primers. Five microliters of the reaction was added to PCR mix (50 μl) containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 30 pmol of 5'-primer, 30 pmol of 3'-primer, and 2 units of Taq DNA polymerase (PerkinElmer Life Sciences). PCR amplification (94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min (35 cycles for mtTFB1 and 25 cycles for RP49), with an initial step of 94 °C for 1 min and a final step of 72 °C for 2 min) was performed with primer combinations of 5'-*d-mtTFB1* (5'-TGCAGTTCATGAAGCTGATC-3') and 3'-*d-mtTFB1* (5'-AGTCTGTATAGCTTACCAG-3') and 5'-RP49 (5'-GACCATCCGCCAGCATAC-3') and 3'-RP49 (5'-AGAA-

CGCAGGCGACCGTTG-3'). RT-PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gels and detected by staining with ethidium bromide.

Immunoblotting—Total cellular protein (20 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was fractionated by 10.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose filters. Filters were preincubated for 1 h with 5% skim milk in PBS, followed by incubation for 1 h with *d-mtTFB1* antibody (1:20) in PBS containing 0.1% Tween 20. Filters were washed four times with PBS containing 0.1% Tween 20, incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Bio-Rad), and washed with PBS containing 0.1% Tween 20. Protein bands were visualized using ECL Western blotting reagents (Amersham Biosciences). Polyclonal antibody against *Drosophila* mtTFB2 was prepared and used as described in Ref. 13.

Northern and Southern Blotting—Total cellular RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA (5 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was fractionated in a 1.2% agarose-formaldehyde gel, blotted onto Hybond-N+ nylon membrane (Amersham Biosciences), and hybridized to ³²P-labeled probes for each of the following four genes: ribosomal protein 49 (RP49), cytochrome *b* (Cytb), NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4), and 12S rRNA. Hybridization was carried out for 16 h at 42 °C in 5× SSPE (150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate (pH 7.4), and 1 mM EDTA), 0.5% SDS, 5× Denhardt's solution, and 50% formamide. The membrane was washed twice at room temperature with 2× SSC containing 0.1% SDS, washed twice with 0.1× SSC containing 0.1% SDS for 30 min at 65 °C, and then analyzed with a PhosphorImager (Amersham Biosciences). The signal for RP49 was used to normalize mitochondrial transcripts.

Genomic DNA was purified from *Drosophila* Schneider S2 cells by standard methods. DNA (5 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was cleaved with XhoI, fractionated in a 0.8% agarose/TBE gel, and transferred to nylon membrane. Hybridization was performed as described above. Filters were washed three times for 10 min at room temperature with 2× SSC containing 0.1% SDS, washed once for 30 min at 65 °C with 0.2× SSC containing 0.1% SDS, and then analyzed with a PhosphorImager. Blots were probed with radiolabeled DNAs for the mitochondrial gene *Cytb* and the nuclear histone gene cluster. The ratio of the signals for these two genes was used to determine the relative copy number of mtDNA.

RESULTS

RNAi-dependent Knockdown of *d-mtTFB1* Does Not Reduce Mitochondrial Transcription and Does Not Induce mtDNA Depletion in Schneider Cells—The sequence of a putative *d-mtTFB1* (10) was used to identify and clone a full-length cDNA by RACE. The cDNA clone obtained is 1530 nucleotides and encodes a predicted polypeptide of 330 amino acids. Rabbit antiserum was raised against a recombinant, truncated form of *d-mtTFB1* (Gly-12 to Leu-330). The antibody detects a single polypeptide in mitochondrial extracts from *Drosophila* Schneider cells with an electrophoretic mobility corresponding to an approximate molecular mass of 38 kDa (Fig. 1A). Immunoblot analysis of subcellular fractions of *Drosophila* Schneider cells demonstrated that *d-mtTFB1* is localized to the mitochondria (data not shown).

The abundance of *d-mtTFB1* was reduced by expressing a metallothionein-inducible *d-mtTFB1*-targeted RNAi species (19–21) from the plasmid pMt/invB1/Hy. The RNA species produced forms a double-stranded RNA hairpin homologous to *d-mtTFB1*. Previous studies indicate that double-stranded RNA hairpins are efficient RNAi inhibitors (22–24).

Cells stably expressing pMt/invB1/Hy or the control plasmid pMt/Hy were cultured for 10 days in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. Immunoblot analysis of copper-treated cells showed an undetectable level of *d-mtTFB1* in cells carrying pMt/invB1/Hy (Fig. 1B). Basal, uninduced expression from pMt/invB1/Hy also repressed expression of *d-mtTFB1* by 6-fold. In contrast, expression of *d-mtTFB2* was unchanged under all experimental conditions. RT-PCR analysis of copper-treated cells showed that cells carrying pMt/invB1/Hy expressed 20-fold less *d-mtTFB1* RNA than cells carrying the control vector, and basal, uninduced expression from pMt/invB1/Hy also suppressed expression of *d-mtTFB1* RNA by 7-fold (Fig. 1C). Copper-treated cells carrying pMt/invB1/Hy showed moderate growth retardation, but copper treatment

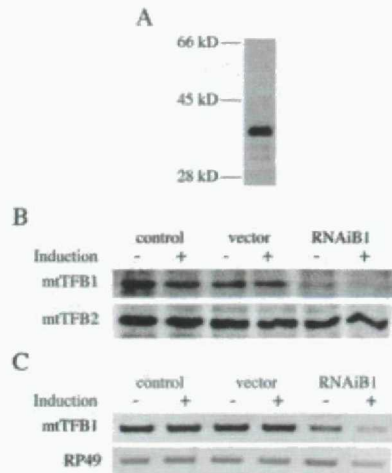


FIG. 1. Expression of *d*-mtTFB1-targeted RNAi in Schneider cells. *A*, immunoblot analysis of mitochondrial extracts probed with affinity-purified rabbit antiserum against *d*-mtTFB1. *B*, Schneider cells with no plasmid (*control*) or carrying pMt/Hy (*vector*) or pMt/invB1/Hy (*RNAiB1*) were cultured for 10 days in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. Protein extracts (20 µg) were fractionated by 10.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, and probed with rabbit antiserum against *d*-mtTFB1 or *d*-mtTFB2 as indicated. *C*, total RNA was extracted from Schneider cells (*control*) or Schneider cells carrying pMt/Hy (*vector*) or pMt/invB1/Hy (*RNAiB1*) after 10 days of culture in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. RNAs were analyzed by RT-PCR. PCR products were run on a 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The relative abundance of the *d*-mtTFB1 PCR product was evaluated by densitometric scanning and normalizing its level to that of nuclear *RP49* as a control.

had no adverse effects on growth of control cells (data not shown). This finding contrasts with the poor growth and reduced viability phenotype we observed upon similar reduction of *d*-mtTFB2 using the RNAi strategy (13).

The biological function of *d*-mtTFB1 was examined in cells expressing *d*-mtTFB1-targeted RNAi. Transcription of several mitochondrial genes and mtDNA copy number were measured in cells with no plasmid and cells carrying pMt/Hy or pMt/invB1/Hy. Northern blots were used to quantitate the relative expression of the *Cytb*, *ND4*, and *12S rRNA* genes in cells grown for 10 days in the presence or absence of copper. Neither basal nor induced expression of *d*-mtTFB1-targeted RNAi resulted in reduced transcript levels for *12S rRNA*, *ND4*, or *Cytb* (Fig. 2); transcript levels were unchanged, both before and after induction, as compared with the level of transcripts from the nuclear gene *RP49* used as a control. These results argue that either *d*-mtTFB1 is not critical for transcription of either strand of *Drosophila* mtDNA or its endogenous level is markedly higher than that which is required for transcription. With regard to the latter, however, we find that the physiological level of *d*-mtTFB1 is, at most, severalfold higher than that of *d*-mtTFB2 (data not shown). RNAi knockdown of *d*-mtTFB2 (13) but not *d*-mtTFB1 results in a substantial reduction in mitochondrial transcription. This, combined with the observation that mtTFB2 is apparently 10-fold more effective in stimulating mitochondrial transcription *in vitro* than mtTFB1 (6), supports our conclusion of the relative lack of physiological importance of mtTFB1 in mitochondrial transcription.

The copy number of mtDNA was also unchanged in cells expressing *d*-mtTFB1-targeted RNAi. Total cellular DNA was isolated from cells with no plasmid and cells carrying pMt/Hy or pMt/invB1/Hy, cleaved with *Xho*I, and analyzed by Southern blot. Blots were hybridized sequentially with probes for the nuclear histone gene cluster and for the mitochondrial gene *Cytb* (Fig. 3A). Relative mtDNA copy number was determined

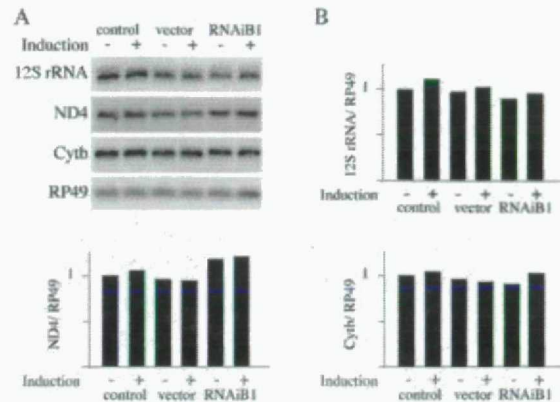


FIG. 2. Effects of RNAi on the level of mitochondrial transcription. *A*, total RNA (5 µg) was extracted from Schneider cells (*control*) or Schneider cells carrying pMt/Hy (*vector*) or pMt/invB1/Hy (*RNAiB1*) after 10 days of culture in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. RNA was fractionated in a 1.2% agarose/formaldehyde gel, blotted to nylon membrane, and hybridized with radiolabeled probes for the mitochondrial transcripts *12S rRNA*, *ND4*, and *Cytb* and the nuclear transcript *RP49*. *B*, relative transcription efficiency was quantitated by normalizing mitochondrial transcript abundance to that of *RP49*.

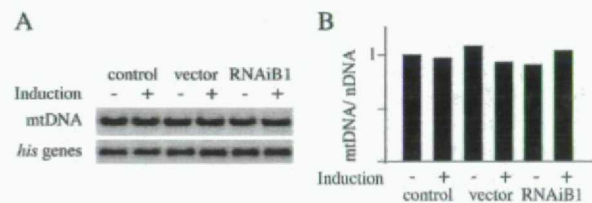


FIG. 3. Effect of RNAi on the copy number of mtDNA. *A*, total DNA (5 µg) was isolated from control Schneider cells (*control*) or Schneider cells carrying pMt/Hy (*vector*) or pMt/invB1/Hy (*RNAiB1*) after 10 days of culture in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. DNA was digested with *Xho*I, fractionated in a 0.7% agarose/TBE gel, and blotted to nylon membrane. The membrane was hybridized with radiolabeled probe for the histone gene cluster (*control*) and then stripped and re-hybridized with radiolabeled probe for *Cytb*. *B*, relative mtDNA copy number was quantitated as described under "Experimental Procedures."

from the ratio of *Cytb* hybridization to histone cluster hybridization (Fig. 3B). After induction of *d*-mtTFB1-targeted RNAi for 10 days, relative mtDNA copy number was almost the same as the control. This result suggests that *d*-mtTFB1 is not critical for maintenance of mtDNA.

Overexpression of *d*-mtTFB1 Has No Effect on Mitochondrial Transcription or mtDNA Copy Number—*d*-mtTFB1 was subcloned into the inducible expression vector pMt/Hy under the control of the metallothionein promoter. The resulting expression vector, pMt/mtTFB1/Hy, was introduced into Schneider cells, and stable cell lines harboring this plasmid were cultured in the presence of 0, 0.05, 0.1, and 0.4 mM CuSO₄. After 10 days of incubation, immunoblot analysis indicated a 2–50-fold increase in *d*-mtTFB1 relative to that in the uninduced control (Fig. 4A). At the same time, *d*-mtTFB2 expression was unchanged under all experimental conditions (Fig. 4A). Overexpression had no effect on cell growth or viability (data not shown). The effect of *d*-mtTFB1 overexpression on mitochondrial transcript abundance was evaluated by Northern blots. Blots were probed for transcripts from the mitochondrial *12S rRNA*, *ND4*, and *Cytb* genes and for nuclear *RP49* gene as a control (Fig. 4B). We found that the levels of all three mitochondrial RNA transcripts were unchanged. Similarly, we found that the relative copy number of mtDNA was also unchanged in cells that overexpress *d*-mtTFB1 (Fig. 4C).

RNAi-dependent Knockdown of *d*-mtTFB1 Reduces the Efficiency of Mitochondrial Translation—The apparent lack of mo-

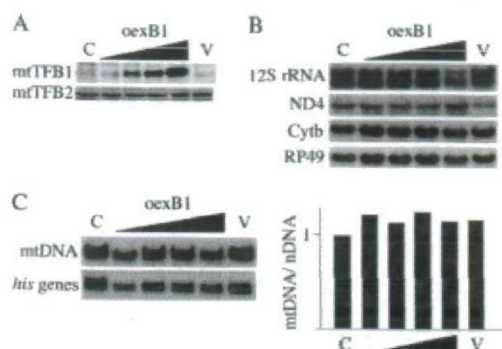


FIG. 4. **mtRNA and mtDNA abundance in Schneider cells overexpressing *d*-mtTFB1.** Schneider cells (control, C) or Schneider cells carrying pMt/Hy (vector, V) or pMt/mtTFB1/Hy (*oexB1*) were grown for 10 days in the presence or absence of CuSO₄ as described under "Experimental Procedures." A, immunoblot analysis of *d*-mtTFB1 and *d*-mtTFB2 was carried out as described in the Fig. 1 legend. B, Northern blot analysis using probes for 12S rRNA, ND4, Cytb, and RP49 was carried out as described in the Fig. 3 legend. C, Southern blots were probed with radiolabeled mtDNA probe (left panel, top blot) or control probe (left panel, bottom blot). Right panel, mtDNA abundance was determined as described in the Fig. 3 legend.

lecular defects in either mitochondrial transcription or mtDNA replication, upon either RNAi knockdown or overexpression of *d*-mtTFB1, and recent studies showing that human mtTFB1 catalyzes rRNA adenosine dimethyltransferase activity when expressed in *E. coli* (11) led us to examine mitochondrial protein synthesis in cells with no plasmid and cells carrying pMt/Hy or pMt/invB1/Hy. The cell lines were cultured for 10 days in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. Pulse labeling of mitochondrial translation was then performed for 2 h in the presence of emetine and cycloheximide, specific inhibitors of cytoplasmic protein synthesis, and Fig. 5 shows the mitochondrial protein synthesis pattern obtained. This pattern was eliminated in the presence of 100 μ g/ml chloramphenicol, a specific inhibitor of mitochondrial protein synthesis (data not shown). We observed no significant effect on mitochondrial translation in either cells carrying no plasmid or cells carrying pMt/Hy in the presence or absence of induction. However, basal expression of *d*-mtTFB1-targeted RNAi reduced the newly synthesized mitochondrial proteins to 70% of their levels in control cells, and after induction in the presence of copper, mitochondrial protein synthesis was reduced further to 40% of that in control cells. These data show that *d*-mtTFB1 modulates mitochondrial translation in Schneider cells. The fact that we observed only a modest effect on translation despite a large reduction in mtTFB1 levels suggests endogenous *d*-mtTFB1 exceeds that required for dimethylation of mitochondrial 12S rRNA. Consistent with that conclusion, we found that a 2–50-fold overexpression of *d*-mtTFB1 has no effect on either the pattern or abundance of mitochondrial proteins (data not shown).

DISCUSSION

Drosophila mtTFB1 shares homology with human mtTFB1, which has been shown to stimulate mitochondrial transcription *in vitro* (6) and to have rRNA adenine dimethyltransferase activity in bacteria (11). In *Drosophila* Schneider cells treated with RNAi, *d*-mtTFB1 is expressed at 5% of the endogenous level. Although abundance of mitochondrial transcripts and mtDNA copy number were unchanged, RNAi treatment reduces the level of mitochondrial protein synthesis. Overexpression of *d*-mtTFB1 does not stimulate transcription of mitochondrial genes, nor does it increase mtDNA copy number. These data provide the first evidence that animal mtTFB1 plays a significant role in mitochondrial translation but apparently

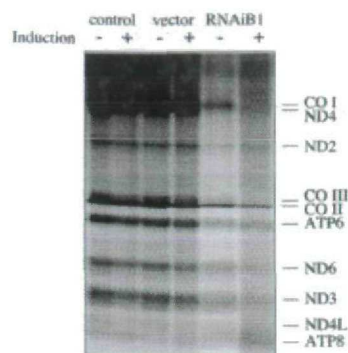


FIG. 5. **Effect of RNAi on mitochondrial protein synthesis.** Mitochondrial translation products were labeled in Schneider cells (control) or Schneider cells carrying pMt/Hy (vector) or pMt/invB1/Hy (RNAiB1) after 10 days of culture in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. Labeling was carried out with [³⁵S]-Trans-label for 2 h in the presence of emetine and cycloheximide, and then total cell lysates were prepared. Aliquots (30 μ g) were fractionated by 15–20% gradient SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue and then autoradiographed. Cytochrome oxidase subunits are indicated as CO I, CO II, and CO III; NADH dehydrogenase subunits are indicated as ND2, ND3, ND4, ND4L, and ND6; and H⁺-ATPase subunits are indicated as ATP6 and ATP8.

does not serve a critical function in mitochondrial transcription or mtDNA maintenance *in vivo*.

In an earlier report (13), we demonstrated that the abundance of *d*-mtTFB2 influences both mitochondrial transcription and the efficiency of mtDNA replication. It is particularly significant that RNAi knockdown of *d*-mtTFB2 lowers the efficiency of mitochondrial transcription in *Drosophila* cultured cells because the data suggest strongly that endogenous mtTFB1 cannot complement a deficiency in mtTFB2. In striking contrast, neither RNAi knockdown nor overexpression of mtTFB1 affects the levels of mitochondrial transcripts or mtDNA copy number in *Drosophila* cultured cells. *In vitro* studies have shown that both mtTFB1 and mtTFB2 support transcription from human mitochondrial promoters (6), but their relative importance and specific roles are not well understood. Our data argue strongly that either mtTFB1 does not play an important role in mitochondrial transcription *in vivo* or endogenous mtTFB2 is functionally redundant with the role of mtTFB1 in transcription. In this regard, it has been reported that *h*-mtTFB1 has rRNA methyltransferase activity (11) and that *h*-mtTFB2 is at least 1 order of magnitude more active in promoting transcription *in vitro* than *h*-mtTFB1 (6).

In composite, our current and previous data (13) document functional differences between mtTFB1 and mtTFB2 *in vivo*. Both mtTFB1 and mtTFB2 are related in primary sequence to a family of rRNA adenine dimethyltransferases that modify two adjacent adenosine bases near the 3'-end of small subunit rRNA to produce N⁶,N⁶-dimethyladenosine (25), and Shadel and co-workers (11) have shown that *h*-mtTFB1 can methylate *E. coli* small rRNA *in vivo*. Fig. 6 shows an amino acid sequence alignment between bacterial (KsgA and ErmC') and yeast (Dim1) rRNA adenine dimethyltransferases and mtTFBs. KsgA and ErmC' are well-studied rRNA adenine dimethyltransferases (26–29), and the three-dimensional structure of sc-mtTFB (30) is very similar to those of KsgA (31) and ErmC' (32). Thus, we aligned KsgA, ErmC', and sc-mtTFB based on their structures, and the mtTFB1s and mtTFB2s are aligned based on sequence homology with KsgA and ErmC'. The N-terminal domains of KsgA and ErmC' share a negatively charged pocket that corresponds to residues in the canonical S-adenosyl-L-methionine (S-AdoMet)-binding site, and 12 residues in ErmC' were shown to interact directly with S-AdoMet

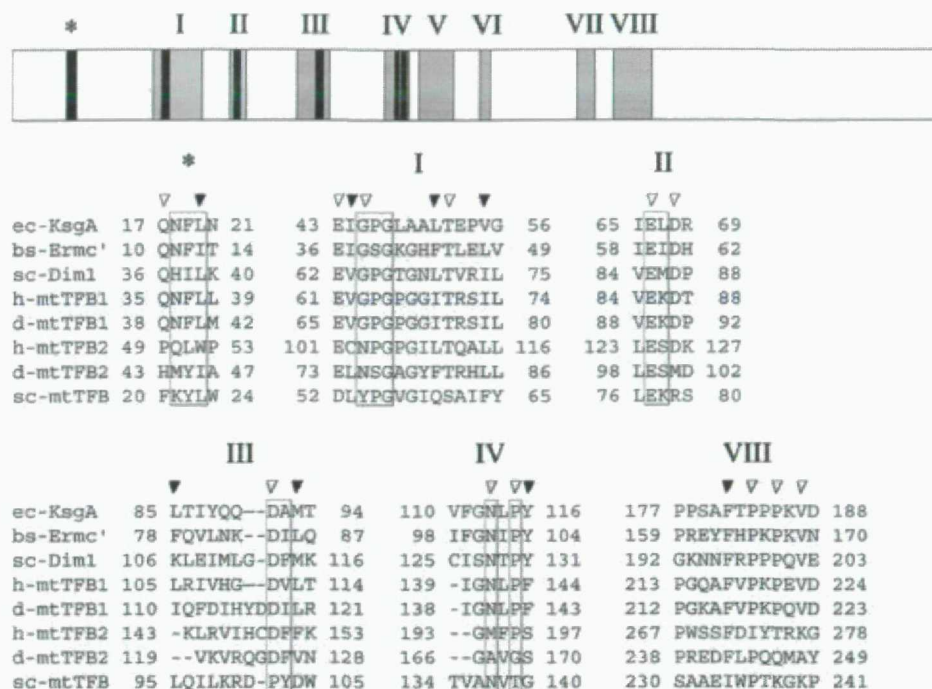


FIG. 6. Structure-based sequence alignment of *Drosophila* mtTFB1 with other mtTFBs and rRNA adenine dimethyltransferases. Top panel, schematic diagram of the sequence organization of KsgA (31); eight amino acid sequence motifs common to S-AdoMet-dependent methylases are indicated in gray, and regions shown to contact S-AdoMet are indicated in black. The motif indicated by the asterisk is an additional conserved sequence identified in the co-crystal structure of ErmC' that makes contact with S-AdoMet (32). Bottom panel, the indicated sequence motifs identified in the schematic diagram are shown; open arrowheads identify residues that are absolutely conserved among KsgA family enzymes, and closed arrowheads identify residues that are highly conserved. Boxed residues make direct contact with S-AdoMet in ErmC'. *E. coli*, ec; *Bacillus subtilis*, bs; *S. cerevisiae*, sc; human, h; *Drosophila*, d.

(33). Most of these residues are well conserved in ErmC', KsgA, Dim1, and mtTFB1s but are poorly conserved in sc-mtTFB and mtTFB2s. Absolutely conserved residues among KsgA family members that are indicated in Fig. 6 are also well conserved in ErmC', Dim1, and mtTFB1s. In contrast, fewer than half are conserved in sc-mtTFB and mtTFB2s. Notably, mutations in these residues have been documented to be poorly tolerated for methyltransferase activity. For example, the activity of the N101A mutant in ErmC' is reduced to 10% *in vivo* and is eliminated *in vitro*; a Y104A mutation in ErmC' was inactive both *in vivo* and *in vitro* (27). These 2 residues are not well conserved in sc-mtTFB and mtTFB2. The comparative data suggest strongly that d-mtTFB1 has rRNA adenine dimethyltransferase activity like h-mtTFB1 and that sc-mtTFB and mtTFB2 do not. Modification by dimethylation of two adjacent adenosine bases at the 3'-end of the small rRNA is conserved in bacteria and animal mtDNA (25). Indeed, the structure of this entire region is highly conserved. Whereas the functional role of the dimethyladenosine modification in mitochondrial small rRNA is unknown, the importance of this modification has been studied in *E. coli* using mutants in *ksgA*. *ksgA* mutants fail to dimethylate the 16S rRNA and, in consequence, are resistant to kasugamycin, an antibiotic in the aminoglycoside family (29, 34, 35). The non-dimethylated ribosome is mildly impaired in protein synthesis, mainly at the initiation and elongation steps, and *ksgA* mutants show a slight decrease in growth (29, 36–38). Our data show that the abundance of d-mtTFB1 influences the efficiency of mitochondrial translation and is consistent with these observations. *Saccharomyces cerevisiae* Dim1, an ortholog of KsgA, is an 18S rRNA dimethylase. *S. cerevisiae* Dim1 is essential for viability, and loss of *S. cerevisiae* Dim1 activity that eliminates 18S rRNA methylation also results in the inhibition of rRNA processing of the 18S precursor at a step prior to adenosine dimethylation. In contrast, rRNA processing

does not occur in animal mitochondria, and in mtTFB1-depleted *Drosophila* cells, we did not detect any change in either the level or electrophoretic mobility of the mitochondrial small subunit rRNA. Differing from animals, *S. cerevisiae* has only one mtTFB gene, sc-mtTFB, and mitochondrial 12S rRNA is not methylated on the two adenosine bases (25, 39). It is particularly significant that RNAi knockdown of d-mtTFB1 lowers the efficiency of mitochondrial translation in *Drosophila* cultured cells because the data suggest strongly that endogenous mtTFB2 cannot complement a deficiency in mtTFB1 in its role in translation. These data are consistent with a lack of adenine dimethyltransferase activity in sc-mtTFB and mtTFB2s.

Taken together, our data suggest strongly that the primary roles of mtTFB1 and mtTFB2 differ *in vivo*; mtTFB1 is an rRNA adenine dimethyltransferase that influences the efficiency of mitochondrial translation, and mtTFB2 is a critical mitochondrial transcription factor.

Acknowledgment—We thank Carol Farr for help with the figures.

REFERENCES

- Gaspari, M., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1659, 148–152.
- Shadel, G. S. (2004) *Trends Genet.* 20, 513–519.
- Ghivizzani, S. C., Madsen, C. S., Nelen, M. R., Ammini, C. V., and Hauswirth, W. W. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 7717–7730.
- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., and Kang, D. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31, 1640–1645.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A. M., and Spelbrink, J. N. (2003) *Mol. Biol. Cell* 14, 1583–1596.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2002) *Nat. Genet.* 31, 289–294.
- Parisi, M. A., and Clayton, D. A. (1991) *Science* 252, 965–969.
- Fisher, R. P., Topper, J. N., and Clayton, D. A. (1987) *Cell* 50, 247–258.
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2004) *EMBO J.* 23, 4606–4614.
- McCulloch, V., Seidel-Rogol, B. L., and Shadel, G. S. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22, 1116–1125.
- Seidel-Rogol, B. L., McCulloch, V., and Shadel, G. S. (2003) *Nat. Genet.* 33, 23–24.

12. McCulloch, V., and Shadel, G. S. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5816–5824
13. Matsushima, Y., Garesse, R., and Kaguni, L. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 26900–26905
14. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410
15. Horton, P., and Nakai, K. (1997) *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **5**, 147–152
16. Claros, M. G., and Vincens, P. (1996) *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–786
17. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
18. Bunch, T. A., Grinblat, Y., and Goldstein, L. S. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 1043–1061
19. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000) *Nature* **404**, 293–296
20. Baulcombe, D. C. (1999) *Curr. Biol.* **9**, R599–R601
21. Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998) *Cell* **95**, 1017–1026
22. Lam, G., and Thummel, C. S. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 957–963
23. Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**, 896–898
24. Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2000) *J. Neurogenet.* **13**, 257–264
25. Van Knippenberg, P. H., Van Kimmenade, J. M., and Heus, H. A. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 2595–2604
26. Lu, Q., and Inouye, M. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 5243–5246
27. Maravic, G., Feder, M., Pongor, S., Flogel, M., and Bujnicki, J. M. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 99–109
28. Maravic, G., Bujnicki, J. M., Feder, M., Pongor, S., and Flogel, M. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 4941–4949
29. van Buul, C. P., Visser, W., and van Knippenberg, P. H. (1984) *FEBS Lett.* **177**, 119–124
30. Schubot, F. D., Chen, C. J., Rose, J. P., Dailey, T. A., Dailey, H. A., and Wang, B. C. (2001) *Protein Sci.* **10**, 1980–1988
31. O'Farrell, H. C., Scarsdale, J. N., and Rife, J. P. (2004) *J. Mol. Biol.* **339**, 337–353
32. Bussiere, D. E., Muchmore, S. W., Dealwis, C. G., Schluckebier, G., Nienaber, V. L., Edalji, R. P., Walter, K. A., Lador, U. S., Holzman, T. F., and Abad-Zapatero, C. (1998) *Biochemistry* **37**, 7103–7112
33. Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K. D., Kavanaugh, T. J., and Abad-Zapatero, C. (1999) *J. Mol. Biol.* **289**, 277–291
34. Helser, T. L., Davies, J. E., and Dahlberg, J. E. (1971) *Nat. New Biol.* **233**, 12–14
35. Helser, T. L., Davies, J. E., and Dahlberg, J. E. (1972) *Nat. New Biol.* **235**, 6–9
36. Van Knippenberg, P. H. (1986) in *Structure, Function and Genetics of Ribosomes* (Hardesty, B., and Kremaer, G., eds) pp. 412–424, Springer, Berlin
37. Poldermans, B., Roza, L., and Van Knippenberg, P. H. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9094–9100
38. Igarashi, K., Kishida, K., Kashiwagi, K., Tatokoro, I., Kakegawa, T., and Hirose, S. (1981) *Eur. J. Biochem.* **113**, 587–593
39. Klootwijk, J., Klein, I., and Grivell, L. A. (1975) *J. Mol. Biol.* **97**, 337–350

Functional Analysis by Inducible RNA Interference in *Drosophila melanogaster*

Yuichi Matsushima¹, Cristina Adán², Rafael Garesse², and Laurie S. Kaguni¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824-1319 and ²Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

Corresponding author:

Laurie S. Kaguni

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University,
East Lansing, Michigan 48824-1319

E-mail: lskaguni@msu.edu Phone: 517-352-6703 Fax: 517-353-9334

Running title: RNAi in *Drosophila*

Abstract

RNA interference (RNAi) triggered by double stranded RNA (dsRNA) has become a powerful tool for generating loss-of-function phenotypes. It is used to inactivate genes of interest and represents an elegant approach to genome functional analysis by reverse genetics. In *Drosophila*, RNAi has been used in both cell culture and in animals. We have adopted this approach to reveal the physiological roles of a number of proteins involved in mitochondrial DNA metabolism, and present here experimental schemes to induce the stable expression of dsRNA in Schneider cells and in transgenic *Drosophila*.

Key Words: RNAi; RNA interference; *Drosophila*; Schneider Cells; transgenesis; UAS-GAL4 system

1. Introduction

RNA interference (RNAi) triggered by double stranded RNA (dsRNA) was originally found in plants (post-transcriptional gene silencing, PTGS; (1)), fungi (“quelling”; (2)) and *C. elegans* (3), but it has been shown to occur in virtually any organism from protozoa to animals (4). The phenomenon of RNA interference is triggered by dsRNA molecules that are cleaved into smaller RNA duplexes 21-27 nucleotides long by the RNase-III-type endonuclease Dicer. In *Drosophila melanogaster* there are two Dicer isoforms: Dicer-1 (DCR-1) processes microRNAs (miRNAs), and Dicer-2 (DCR-2) is required for long dsRNA cleavage. The small dsRNA molecules, such as siRNAs (short interfering RNAs) and miRNAs, are subsequently unwound and rearranged into effector complexes: RNA-induced silencing complex (RISC), RNA-induced transcriptional silencing (RITS) or miRNA ribonucleoprotein particles (miRNPs). RISC mediates the posttranscriptional degradation of homologous mRNAs, whereas RITS promotes the condensation of heterochromatin, and miRNPs guide translational repression of mRNA targets (5). Although the basic mechanisms by which gene expression are suppressed is not completely understood, RNAi has become a powerful tool for generating loss-of-function phenotypes. It is used to inactivate genes of interest and represents an elegant approach to genome functional analysis by reverse genetics.

In *Drosophila*, RNAi has been used in both cell culture and in animals. The transfection of dsRNA into *Drosophila* Schneider cells was found to have a gene specific silencing function (6), but the transfected dsRNA only works for a short period. However if the dsRNA is produced from a vector integrated into the genome (*i.e.*, in an established

RNAi cell line), the RNAi effect can be monitored continuously. In living organisms, RNAi can be induced by injecting, feeding or expressing dsRNA. Injection of dsRNA into *Drosophila* embryos disrupts gene activity efficiently (7), but its effect is transient, not inherited in the next generation, and genes expressed in later stages of development cannot be inactivated. To overcome these limitations, several strategies have been developed to stably express dsRNA in transgenic *Drosophila*, mainly the use of the UAS-GAL4 system to induce controlled expression of the RNAi.

We are using a systematic RNAi approach to unravel the function of several essential factors that are constituents of the mtDNA replication and transcription machinery in *Drosophila*. In this chapter, we describe protocols to stably generate RNAi in Schneider cell lines using inducible vectors. We also describe the general strategy to induce RNAi in *Drosophila melanogaster* using the UAS (Upstream Activator Sequences, UAS) -GAL4 system.

2. Materials

2.1. RNAi in Schneider cells

2.1.1. Construction of the RNAi vector

1. pMt/Hy DNA (8).
2. Restriction enzymes.
3. GeneElute agarose spin column (Sigma).
4. Platinum *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen).
5. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).
6. T4 DNA ligase.
7. SURE cells (Stratagene).
8. Electroporation device such as the *E. coli* pulser (Bio-Rad).
9. Qiagen Plasmid midi kit (Qiagen).
10. 3 M sodium acetate (pH 5.2).
11. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v).
12. TE buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA.

2.1.2. Establishment of the RNAi cell line

1. Schneider S2 cells.
2. Schneider's *Drosophila* medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco).
3. Effectene Transfection Reagent (Qiagen).
4. Hygromycin (Invitrogen).

5. Phosphate-buffered saline (PBS): 135 *mM* NaCl, 10 *mM* Na₂HPO₄, 2 *mM* KCl, 2 *mM* KH₂PO₄.
6. Lysis buffer: 10 *mM* Tris-HCl, pH 8.0, 5 *mM* EDTA, 1% SDS.
7. BCA Protein Assay Kit (Pierce).

2.2.1. RNAi in flies

1. pUAST DNA (9).

3. Methods

3.1. RNAi of mtTFB1 in Schneider cells

3.1.1. Construction of the RNAi vector

A schematic diagram depicting the structure of a dsRNA expression plasmid targeting the *Drosophila* mtTFB1 gene in Schneider cells is shown in Figure 1.

1. Digest 1 µg of pMt/Hy plasmid DNA with *Xho*I and *Spe*I in a reaction volume of 20 µl.
2. Electrophorese the reaction mixture in a 0.7% agarose gel.
3. Purify the vector from the agarose gel using a standard method, *e.g.*, using a GeneElute agarose spin column.
4. Amplify the sense fragment with Platinum *Pfx* DNA polymerase and the following pair of primers: 5'- CGCctcgagactagtACGGACAAGATAGTCAAGTCG -3' and 5'- CGCcaattcGGGatcgatTAGCTTCTCAGCAACCTCCTC -3, and the antisense fragments with 5'- CGCctcgagactagtACGGACAAGATAGTCAAGTCG -3' and 5'- CGCgaattcAAAaagcttTAGCTTCTCAGCAACCTCCTC.
5. Purify the PCR products with a PCR purification kit, *e.g.*, using the QIAquick PCR Purification Kit.
6. Digest the sense PCR fragment with *Xho*I and *Eco*RI, and digest the antisense PCR fragment with *Spe*I and *Eco*RI.
7. Electrophorese the reaction mixtures in a 1% agarose gel.
8. Purify the fragments from the agarose gel using an appropriate method as above.

9. Ligate the vector DNA with the sense and antisense fragments using T4 DNA ligase at 16°C overnight. Use a molecular ratio of vector: sense fragment: antisense fragment of 1:3:3.
10. Transform *E. coli* host cells with 1 µl of ligation mixture using the *E. coli* pulser, and plate on an LB plate containing ampicillin at 100 µg/ml. We use SURE cells as the host.
11. Recover plasmids from the colonies and check their identity and integrity by restriction endonuclease digestion.
12. Select positive colonies and purify the plasmid DNA, *e.g.*, using a plasmid midi kit.
13. Dissolve the DNA in 400 µl of TE buffer.
14. Add 400 µl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v), mix well, and then separate the phases by centrifugation at 12,000 x g for 5 min.
15. Transfer the aqueous phase to a new tube, add 40 µl of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and 800 µl of ethanol, mix, and incubate at room temperature for 10 min.
16. Centrifuge at 12,000 x g for 10 min and discard the supernatant. Rinse the pellet with 600 µl of 70% ethanol. Centrifuge at 12,000 x g for 5 min and discard the supernatant.
17. Dry the pellet at room temperature for 10 min, and dissolve the pellet in 50 µl of TE buffer.

3.1.2. Establishment of the RNAi cell line

1. Culture *Drosophila* Schneider S2 cells at 25°C in *Drosophila* Schneider Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Subculture cells to 3 to 5 x 10⁶ cells/ml every third to fifth day.

2. Place 4 ml of cells at a density of 3 to 5×10^6 cells/ml into a 60 mm dish 24 hours prior to transfection.
3. Transfect the cells using Effecten according to the manufacturer's instructions (Qiagen).
4. Incubate for 24 to 48 hours at 25°C .
5. Transfer the cells from a 60 mm dish into a 25 cm^2 flask containing 4 ml of fresh *Drosophila* Schneider Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 200 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin.
6. Incubate at 25°C until cells reach a density of 10 to 15×10^6 cells/ml or for 7 to 10 days.
7. Transfer the cells into a 75 cm^2 flask containing 10 ml of fresh *Drosophila* Schneider Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 200 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin.
8. Incubate at 25°C until cells reach a density of 15 to 20×10^6 cells/ml or for 5 to 7 days.
9. Transfer the cells into a 125 cm^2 flask containing 20 ml of fresh *Drosophila* Schneider Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 200 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin.
10. Incubate at 25°C until cells reach a density of 15 to 20×10^6 cells/ml or for 5 to 7 days.
11. Transfer 7 ml of the culture into a 125 cm^2 flask containing 20 ml of fresh *Drosophila* Schneider Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 200 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin.
12. Incubate at 25°C until cells reach a density of 15 to 20×10^6 cells/ml or for 5 to 7 days.

13. Culture the selected Schneider S2 cells at 25°C in *Drosophila* Schneider Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, subculturing to 3 to 5 x 10⁶ cells/ml every third to fifth day.

3.3. Induction of dsRNA expression

1. Dilute the cells to 3 to 5 x 10⁶ cells/mL and add CuSO₄ to a final concentration of 0.4 mM.
2. Incubate at 25°C and subculture to 3 to 5 x 10⁶ cells/ml every third day.
3. After 10 days of culture, harvest the cells by centrifugation at 2,000 x g for 5 min.
4. Wash with PBS and centrifuge at 2000 x g for 5 min.
5. Add lysis buffer, heat at 100°C for 5 min and centrifuge at 12,000 x g for 10 min.
6. Transfer the lysate to a fresh tube and assay the protein concentration, *e.g.*, using the BCA Protein Assay Kit.
7. Check the suppression level of the target protein by immunoblot analysis (Fig. 2.).

3.2. RNAi in flies

One of the most valuable tools available for scientists working in *Drosophila* is the availability of the UAS-GAL4 system (9) that is shown schematically in Figure 3. In this dual system, its two components (UAS and GAL4 transgenic lines) are maintained as independent parental stocks until needed. After crossing, the resulting F1 generation will express the gene (or RNAi) of interest in the pattern driven by GAL4. At present, numerous GAL4 drivers for constitutive or tissue-specific overexpression have been reported in the literature, and a list of them can be obtained from public stock centers

(<http://flystocks.bio.indiana.edu/gal4.htm>). The flexibility of the UAS-GAL4 system has allowed its use for the analysis of many biological processes including the induction of loss-of-function phenotypes through overexpression of RNAi constructs (10).

3.2.1. Construction of the RNAi vector for flies

Construct the vector as described in **Subheading 3.1.1.**, substituting the pMt/Hy plasmid with the appropriately digested pUAST vector.

3.2.2. Generation of UAS-IR lines

Transgenesis in *Drosophila* is based on the use of P-element transformation. There are several standard protocols to obtain transgenic animals that are based on the original method described by Spradling and Rubin (11). Current protocols are very similar with efficiencies ranging from 3 to 12%. We routinely use a protocol that is modified slightly from that of Déjardin and Cavalli, which is available on-line with a detailed description (<http://www.igh.cnrs.fr/equip/cavalli/link.labgoodies.html>). It is highly efficient, yielding ~10 independent transgenic animals from 100 injected embryos. The simplified protocol presented here offers detailed explanatory notes regarding important considerations that we have encountered in our laboratory experience.

3.2.3. Setting the UAS-IR x GAL4 cross and RNAi analysis

1. Collect virgin females from the GAL4 driver stock. Depending on the number of crosses planned, start collecting virgins at the beginning of the week, set the crosses at

the end of the week. At the same time, collect newly hatched UAS-IR males, and plan to use both parental lines as controls.

2. Set the RNAi crosses using the appropriate number of flies according to the size of the food vials selected. Place no less than 10 males and 20 females in a small vial. For a big vial, use 30 males and 50 females and scale it up to 150 flies if needed. When using bottles, use at least 60 males and 100 females.

3. Pass the crossed RNAi lines daily, after allowing flies to remain in the same vial for a couple of days. Keep the incubation temperature constant.

4. Isolate total RNA and protein from embryos, larvae and/or adults. Place the crosses in suitable cages to collect materials at regular time intervals. If the number of flies is small, collect several egg lays and store them at 4°C to gather enough material. Collect larvae and proceed with fresh material if possible for best results, though they may be kept frozen at -70°C at the desired stage. Ten larvae from each cross generally provide a sufficient amount of RNA and protein for analysis. Anesthetize and freeze adults at -70°C until use.

5. Check the RNAi-induced suppression level of the target protein by immunoblot analysis and/or the target RNA by quantitative RT-PCR.

3.2.4. Phenotypic analysis

1. Pass the crossed RNAi lines daily for one to two weeks.

2. Inspect the vials daily and note relevant events and dates in which they occur, such as the beginning of the 1st larval instar, 3rd larval instar wandering, prepuparium formation, pupariation, and eclosion.
3. Perform a detailed progeny analysis on selected vials. Count the number of flies (males and females) daily. If the progeny are not expected to have the same genotype, also count the number of flies of each possible genotype daily.
4. Determine the rate of pupal lethality, life span, reproductive capacity in terms of egg laying, and/or perform behaviour assays as appropriate.

4. Notes

4.1. RNAi in Schneider cells

1. The length of the stem region of a hairpin-type of dsRNA is usually longer than 300 bp. Such constructs have been shown to cause more than 90% reduction of expression of the target gene. However, a shorter dsRNA expression vector with less than a 100 bp stem region is also effective (12).
2. Because of leaky expression from metallothionein promoter, the RNAi construct may repress the target transcript under uninduced conditions (*see* Fig. 2).
3. The RNAi cell lines are stable for at least 3 months. Check the target protein level by immunoblot monthly. If sufficient suppression is not apparent, it is better to establish a new cell line.

4.2. RNAi in flies

1. Although dsRNA can be obtained by several different strategies, in general, two identical fragments of 0.5-1 kb that have sequence identity to the gene to be knocked down are cloned into the pUAST vector in a head-to-head or tail-to-tail orientation. By traditional P-element transformation, a transgenic fly that carries the inverted repeats under UAS control is obtained. Normally, the transgene will remain silent in the absence of GAL4 and only leaky expression of dsRNA will occur.
2. Always work with several UAS-IR independent transgenic lines. Even though dsRNA production will be driven by GAL4, sites of insertion will still have an effect on transgene expression, and some insertions may be lethal due to positional effects.

3. Depending on the driver, RNAi can be set off early in development or not, and may be constitutive or tissue-specific. Therefore, the use of reporter genes such as GFP or lacZ (using UAS-GFP or UAS-LacZ lines currently available) is recommended to obtain the most accurate spatio-temporal expression pattern given by each GAL4 driver.

4. When mating UAS-IR and GAL4 parental lines, do not underestimate the number of flies needed. Crosses should have at least 10-20 individuals. Setting small crosses can result in lethality not related to the RNAi phenotype. Remember to set the appropriate controls so that by comparison, all F1 progeny represent the same gene dosage. Mate UAS-IR virgins to GAL4 driver males and the reverse. When possible, keep parental stocks balanced and maintain each homozygous for IR or GAL4 insertion. When homozygous stocks are used, 100% of the progeny will express dsRNA and show the RNAi phenotype.

5. The function of GAL4 is temperature dependent. Flies can be maintained at a temperature ranging from 16 to 29°C. At low temperature, GAL4 shows little ability to activate transcription and thus, RNAi will have a milder effect. At high temperature there is an increasing activation of transcription by GAL4 that will lead to a more powerful effect of RNAi. Apart from trying different GAL4 drivers, inducing RNAi at different temperatures should also be considered.

Acknowledgements

The work in our laboratories was supported by National Institutes of Health Grant GM45295 to L.S.K., and Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Grant BFU2004-04591) and Instituto de Salud Carlos III, Redes de centros RCMN (C03/08) and



5. References

1. Jorgensen, R. A. (2003) Sense cosuppression in plants: past, present and future. in "RNAi : a guide to gene silencing" (Hannon, G. J., Ed.), pp. 5-22, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
2. Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., and Macino, G. (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation *EMBO J* **15**, 3153-63.
3. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* *Nature* **391**, 806-11.
4. Cogoni, C., and Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms *Curr Opin Genet Dev* **10**, 638-43.
5. Tomari, Y., and Zamore, P. D. (2005) Perspective: machines for RNAi *Genes Dev* **19**, 517-29.
6. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells *Nature* **404**, 293-6.
7. Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway *Cell* **95**, 1017-26.

8. Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P., and Hogness, D. S. (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily *Cell* **67**, 59-77.
9. Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes *Development* **118**, 401-15.
10. Duffy, J. B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife *Genesis* **34**, 1-15.
11. Spradling, A. C. (1986) P element-mediated transformation. in "*Drosophila* A Practical Approach" (Roberts, D. B., Ed.), pp. 175-97, IRL Press, Oxford.
12. Farr, C. L., Matsushima, Y., Lagina, A. T., 3rd, Luo, N., and Kaguni, L. S. (2004) Physiological and biochemical defects in functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and DNA-binding mutants of single-stranded DNA-binding protein *J Biol Chem* **279**, 17047-53.
13. Matsushima, Y., Garesse, R., and Kaguni, L. S. (2004) *Drosophila* mitochondrial transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in Schneider cells *J Biol Chem* **279**, 26900-5.
14. Matsushima, Y., Adan, C., Garesse, R., and Kaguni, L. S. (2005) *Drosophila* mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells *J Biol Chem* **280**, 16815-20.

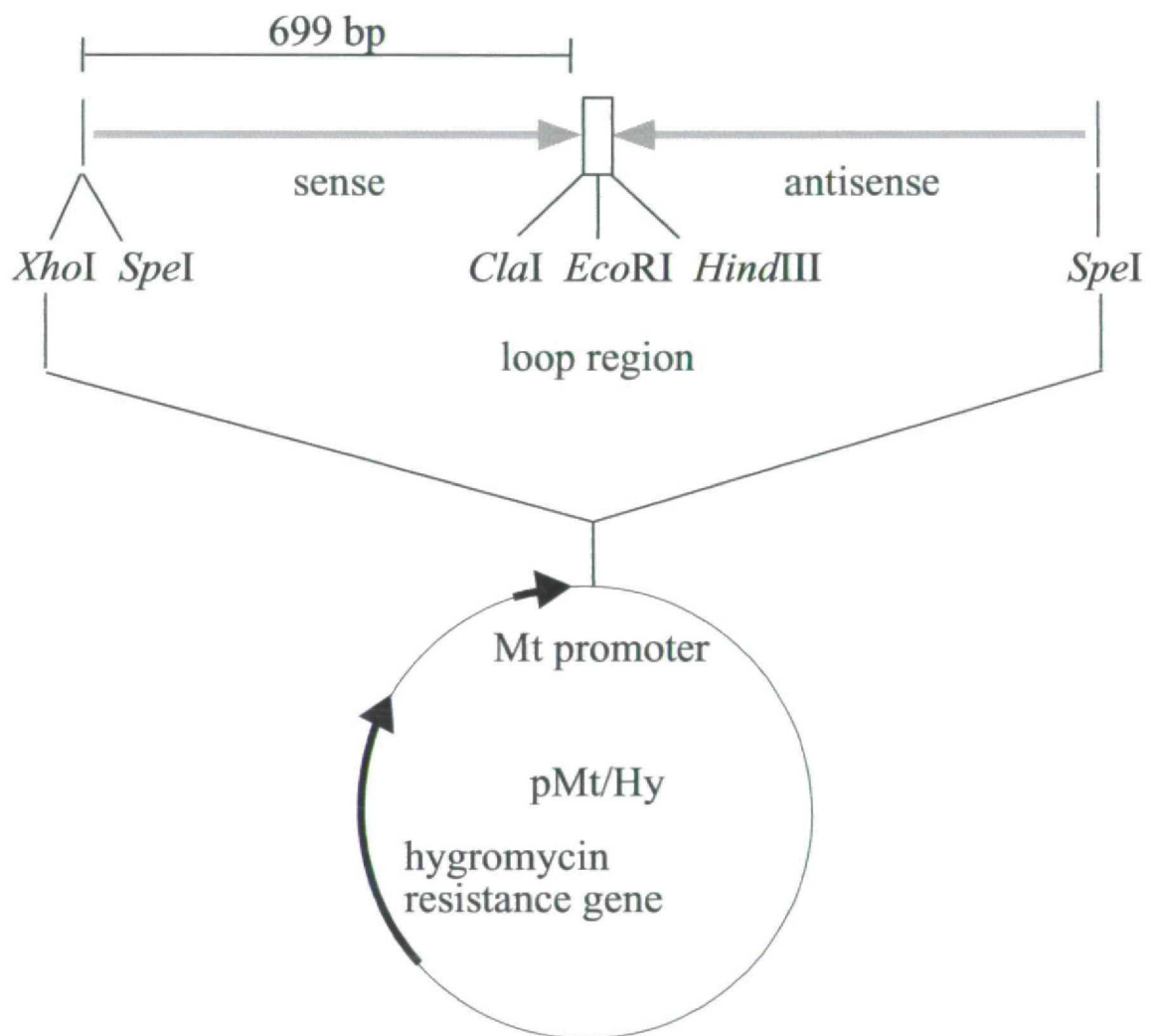
Figure Legends

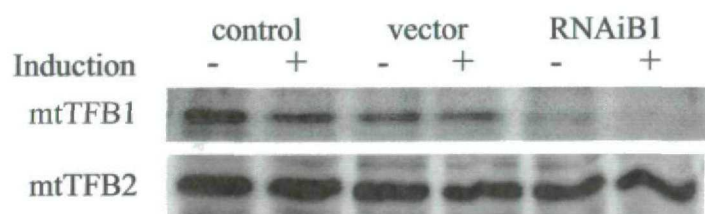
Figure 1. Schematic representation of a dsRNA expression plasmid targeted to the *Drosophila* mtTFB1 gene. Gray arrows show sense and antisense sequences. The open box indicates the loop region. The loop region is 24 nt containing three restriction enzyme sites, *Cla*I – CCC – *Eco*RI – AAA – *Hind*III.

Figure 2. Expression of *d*-mtTFB1-targeted RNAi in Schneider cells. A, immunoblot analysis of mitochondrial extracts probed with affinity-purified rabbit antiserum against *d*-mtTFB1 (14). Schneider cells with no plasmid (*control*) or carrying pMt/Hy (*vector*) or RNAi vector (*RNAiB1*) were cultured for 10 days in the presence or absence of 0.4 mM CuSO₄. Protein extracts (20μg) were fractionated by 10.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters and probed with rabbit antiserum against *d*-mtTFB1 or *d*-mtTFB2 (13) as indicated.

Figure 3. Schematic representation of the UAS-GAL4 strategy. UAS-IR and GAL4 lines are maintained as independent stocks. GAL4 drivers express the transcriptional regulator GAL4 with a constitutive or tissue specific pattern depending on the endogenous enhancer that is located in its proximity. There is a large collection of GAL4 lines available from public stock centers. UAS-IR lines are generated by P-element-mediated transformation. A construct containing in tandem several GAL4 binding sites upstream of the inverted repeat of the target gene is inserted randomly in the genome. Leaky expression is generally very low, showing no phenotype. After crossing the GAL4 drivers with the UAS-IR stocks, the

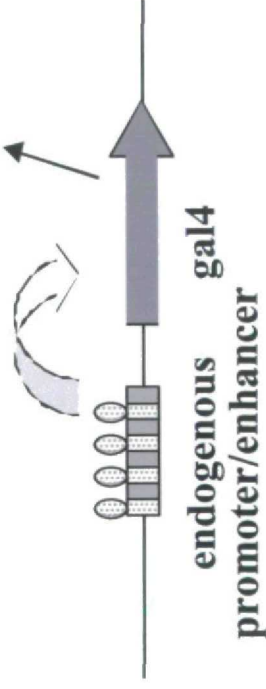
F1 generation expresses the dsRNA directed by GAL4 and induces the RNAi. In this way, a knock-down of the gene of interest is obtained in the animal. The scheme is based on that published by Brand and Perrimon (9).



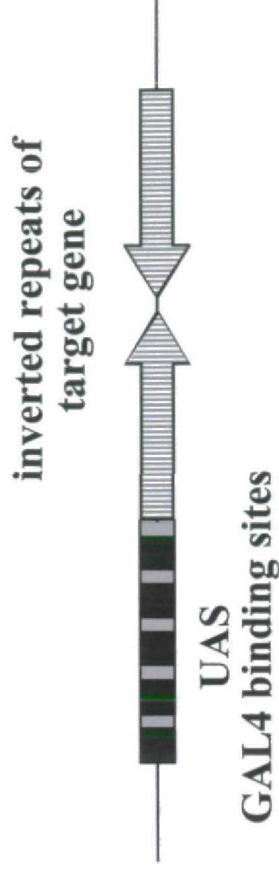


UAS-GAL4 SYSTEM

GAL4 drivers



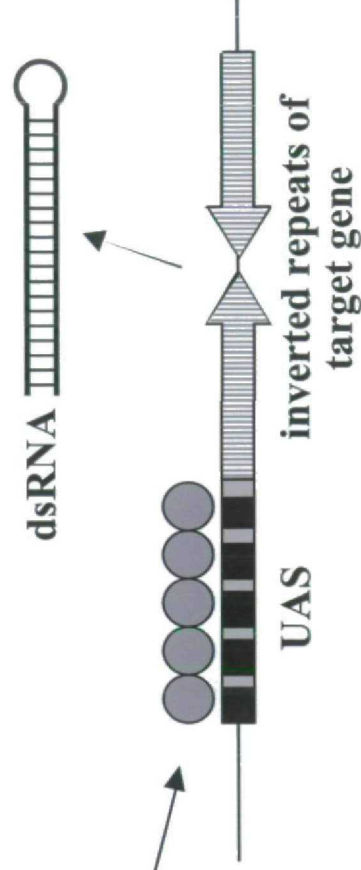
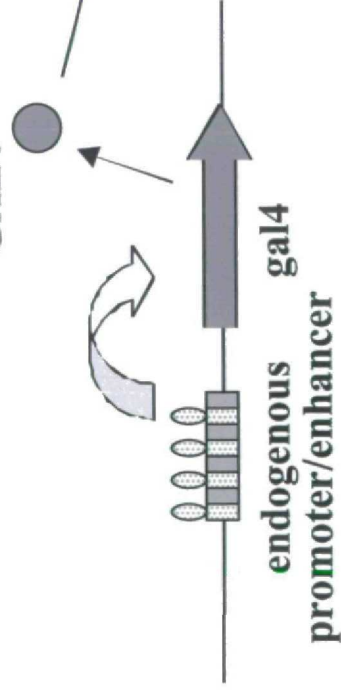
UAS-IR lines



X

RNAi lines

GAL4



dsRNA

Modeling human mitochondrial diseases in flies

Álvaro Sánchez-Martínez¹, Ningguang Luo², Paula Clemente¹, Cristina Adán¹, Rosana Hernández-Sierra¹, Pilar Ochoa¹, Miguel Ángel Fernández-Moreno¹, Laurie S. Kaguni² and Rafael Garesse^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, E-28029 Madrid, Spain.

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824-1319, USA.

* To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. C/Arzobispo Morcillo 4, E-28029 Madrid, Spain. Phone: +34 91 4975452, Fax: +34 91 5854401. E-mail: rafael.garesse@uam.es

Keywords: *Drosophila*; mitochondria; mitochondrial diseases; gene targeting; oxidative phosphorylation

Summary

Human mitochondrial diseases are associated with a wide range of clinical symptoms, and those that result from mutations in mitochondrial DNA affect at least 1 in 8500 individuals. The development of animal models that reproduce the variety of symptoms associated with this group of complex human disorders is a major focus of current research. *Drosophila* represents an attractive model, in large part because of its short life cycle, the availability of a number of powerful techniques to alter gene structure and regulation, and the presence of orthologs of many human disease genes. We describe here *Drosophila* models of mitochondrial DNA depletion, deafness, encephalopathy, Freidreich's ataxia, and diseases due to mitochondrial DNA mutations. We also describe several genetic approaches for gene manipulation in flies, including the recently developed method of targeted mutagenesis by recombinational knock-in.

Introduction

The fruit fly *Drosophila* has played a critical role in the origin and development of modern biology, particularly in the field of genetics. In 1910, T. H. Morgan's experiments demonstrating the chromosome theory of heredity initiated *Drosophila* as a tool to investigate the basis of genetics and development [1]. Features that made *Drosophila* useful as an animal model in the first half of the past century are still attractive today [1,2]. These include i) a short life cycle, ii) the facility to feed and maintain stocks and populations without specialized instrumentation or infrastructure, iii) the availability of non-recombinogenic balancer chromosomes, iv) physical mapping of genes on polytene chromosomes, v) the straightforward use of X-rays and other mutagenic agents to generate large collections of mutant stocks and, vi) the physical accessibility of the mechanosensory apparatus for experimentation. During the remainder of the century, new technologies were developed to manipulate and understand the *Drosophila* genome, leading to remarkable discoveries such as the genetic control of embryonic development by E. Lewis, C. Nüsslein-Volhard and E. Wieschaus [3]. Advances in molecular biology have allowed the generation of transgenic flies using P-element transposons [4], the development of the yeast UAS-GAL4-based gene overexpression system [5] and more recently, technologies based on site specific recombination to knock-in and knock-out specific genes, and RNA interference (RNAi) to knock-down gene expression (for a review, see [6]). At the same time, *Drosophila melanogaster* was one of the first organisms to be sequenced in its entirety. The first annotated sequence was published in March 2000, and it has been updated regularly (<http://flybase.net/annot/dmel-release4-notes.html>). The *Drosophila* genome contains a large number of human orthologs, demonstrating its potential as a model of human disease [7].

Mitochondrial biogenesis in *Drosophila*

Mitochondrial biogenesis is an essential process in cell proliferation and differentiation. It depends on the co-ordinated expression of two genomes located in different subcellular compartments, the nucleus and the mitochondrion [8]. Mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular double-stranded DNA molecule with an extremely compact organization, and a gene content that is well conserved in the animal kingdom. It encodes 22 tRNAs, 2 rRNAs and 13 polypeptides, all of which are components of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). The rest of the subunits of the OXPHOS system (about 90) and all of the proteins involved in the maintenance and expression of mtDNA, and all other mitochondrial functions, are encoded in nuclear DNA [8].

In the last few years, several mammalian transcriptional regulators have been characterized that control the expression of both nuclear and mitochondrial genes, and therefore play a critical role in intergenomic communication [9]. Extracellular signals induce expression of PGC-1 family coactivators, which in cooperation with specific transcription factors (mainly Nuclear Respiratory Factors, NRF-1 and NRF-2), have been found to regulate the expression of many genes involved in mitochondrial biogenesis. These include structural subunits of the OXPHOS system, enzymes involved in intermediary metabolism, and several factors involved in mtDNA maintenance and transcription (reviewed in [10]). A similar framework to explain the integrated control of *Drosophila* mitochondrial gene expression has not been identified. The ortholog of *nrf-1* in *Drosophila*, *erect wing*, is essential for neurogenesis and myogenesis [11], but it has not been linked directly to regulation of mitochondrial gene expression. Thus, it is presently unknown if the circuitry that coordinates mitochondrial biogenesis at the transcriptional level in mammals is conserved in *Drosophila*.

Our laboratories have carried out a systematic characterization of the promoter regions of *Drosophila* genes encoding factors involved in mtDNA replication, maintenance and transcription [reviewed in [12]]. To date these include the genes encoding the two subunits of DNA polymerase γ (α and β), mtSSB, mtDNA helicase, mtRNA polymerase, TFAM, mtTFB1, mtTFB2 and mtTTF (Table 1). We have found that the expression of most of these genes is regulated by DREF, a transcription factor that also regulates the expression of genes involved in nuclear DNA replication and cell cycle control, including the catalytic subunit of DNA polymerase α , proliferating cell nuclear antigen, cyclin A and E2F [12]. In addition, a recently identified conserved sequence element (RTTAYRTAAY), designated as the Nuclear Respiratory Gene element (NRG), is located downstream of the transcriptional initiation site of a high proportion of nuclear genes encoding mitochondrial proteins [13]. Although there are no functional studies and the transcription factors that recognize the NRG site have yet to be identified, this element represents a good candidate for involvement in the coordinate response of genes involved in energy production in *Drosophila*, perhaps in combination with DREF. In support of this hypothesis, several of the genes encoding factors of the *Drosophila* mtDNA replication and transcription machineries contain both DRE and NRG sites.

To begin to understand the regulation of mitochondrial biogenesis during embryonic development, we have studied by *in situ* hybridization and immunostaining the spatio-temporal expression pattern of genes encoding mtDNA replication factors as markers of mitochondrial proliferation, and those encoding structural components of the OXPHOS system as markers of mitochondrial differentiation. We have found that genes involved in mtDNA metabolism are highly expressed in the gut, and in some cases in additional cellular domains of the embryo. OXPHOS genes are also highly expressed in the gut, but are also expressed at high levels in other tissues including the mesoderm (M.A.

Fernández-Moreno and R. Garesse, unpublished data). These results indicate that mitochondrial proliferation and differentiation are not strictly coupled during development.

Interestingly, the molecular characterization of *bonsai* mutants has also revealed that the gut is extremely active in mitochondrial biogenesis during *Drosophila* development [14]. *bonsai* is essential for normal growth in *Drosophila* and mutants exhibit a delay in larval growth, with most individuals dying during this period. The larvae exhibit deficient mitochondrial function, with the gut being the only tissue affected. The larval stage is a period of intense growth, and the gut is amongst the tissues with a highest energy demand at this time of development. The Bonsai protein is highly expressed in the gut, localizes to mitochondria and shows strong homology to prokaryotic ribosomal protein S15, suggesting a role in mitochondrial translation. However, although mitochondrial respiration is diminished, cytochrome oxidase (COX) activity remains unchanged [14]. These observations suggest that the mutant phenotype is not due to a general impairment of mitochondrial translation; rather, at least in *Drosophila*, Bonsai must carry a specific function in the gut.

***Drosophila* as an animal model to study human mitochondrial diseases**

Drosophila provides a useful model for studying several complex biological processes because it is ideally tractable at the genetic, biochemical, molecular and physiological levels. It has served as a model in studies of development and differentiation [3], aging [15], cell cycle [16], transcriptional and translational control [17], signaling pathways [18], response to hypoxia [19], sensorial perception [20], and circadian rhythms [21]. In addition, the presence in *Drosophila* of orthologs of genes involved in human diseases has spawned interest in using it to understand the molecular basis of disease, and to discover new therapies. Representative research using *Drosophila* has been focused on

neurodegenerative diseases [7, 22], cancer [23], cardiac pathologies [24], age-associated dysfunction [25], sensitivity to pollutants [26], and more recently on mitochondrial diseases (see below).

Mitochondrial diseases, mainly due to the alteration of OXPHOS functions, are associated with a wide range of clinical symptoms, especially those in neurodegenerative disorders, such as blindness, deafness, dementia, movement disorders, ataxia, corea, and encephalopathies [27,28]. Mitochondrial defects are also associated with muscular weakness, cardiac failure, diabetes, renal dysfunction and hepatic disease. The clinical and genetic diversity of mitochondrial pathologies makes it difficult to estimate their incidence in the population, which in composite, is considered relatively high. The alteration of OXPHOS function caused by known mutations in mtDNA affects at least 1 in 8500 people. One of the main objectives in understanding the physiopathology of mitochondrial diseases is to create amenable animal models that reproduce the variety of symptoms associated with this group of complex human disorders. Although a great effort is currently focused on developing mammalian models of human mitochondrial pathologies, *Drosophila* emerges as an attractive, tractable alternative.

mtDNA depletion

mtDNA depletion syndrome (MDS) is caused by a defect in intergenomic communication that results in decreased mtDNA content (*i.e.*, a low mtDNA/ nDNA ratio). Children usually present with hypotonia, lactic acidosis and elevated serum creatine kinase. Some also have severe hepatopathy or renal involvement mimicking de Toni-Fanconi syndrome. The symptoms can also involve multiple systems affecting the muscle. Mutations in the genes encoding the mitochondrial deoxyguanosine and deoxythymidine kinases are associated with the hepatocerebral and the myopathic forms of MDS [29]. In

addition, preliminary studies have also shown a deficient activity of DNA polymerase γ in tissues of patients suffering MDS [30].

Our laboratories have used the UAS-GAL4 system to alter the level of mtDNA in the fly. Overexpression of a wild-type version of the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase (pol γ - α) interferes with the process of mtDNA replication and produces a significant decrease in the amount of mtDNA [31]. We have analyzed the consequences of the mtDNA depletion in the whole animal, and specifically in two tissues affected in MDS patients, muscle and nervous system. mtDNA depletion resulting from constitutive overexpression is lethal at the pupal stage, a phenotype that is also observed upon specific overexpression in the muscle. Interestingly, the induction of mtDNA depletion in the nervous system is not lethal. The main phenotype detected in adults is an increase in the population mortality rate, and a moderate but significant increase in apoptosis in the larval brain, which likely contributes to the phenotype. This model presents the opportunity to characterize the molecular and metabolic responses of various tissues to mtDNA depletion, and to develop methods that alleviate it.

Mitochondrial deafness

The *Drosophila* mutant *technical knock-out*, *tko*, carries a point mutation affecting a phylogenetically conserved residue in the nuclear gene encoding mitochondrial ribosomal protein S12 (MRPS12). This behavioural mutant exhibits developmental retardation at the larval stage, bang sensitivity, defective response to sound, quantitatively reduced mitochondrial translational capacity and impaired male courtship [32]. The primary biochemical defect is a decrease in OXPHOS and ATPsynthase activities in mitochondria. *tko* mutants possess various features of mitochondrial disorders in humans, and these phenotypes are reverted by transgenic expression of a wild-type copy of the *tko* gene. The

transgenic reversion analysis revealed critical steps and cell types that were responsible for the disease-like phenotype [33]. Furthermore, inbreeding of mutant lines resulted in a systematic improvement of the phenotypic outcome. These features have made the *tko* mutant a suitable model for many forms of human mitochondrial disease that are characterized by a reduction in the mitochondrial respiratory capacity and a generalized OXPHOS deficiency and in particular, for sensorineural deafness.

Mitochondrial encephalopathy

Mutations in mtDNA and in nuclear-encoded mitochondrial proteins cause a group of devastating encephalomyopathies with complex clinical features [34]. Leigh syndrome (LS) is the most common infantile mitochondrial encephalopathy and is characterized by symmetric necrotic lesions in the brainstem, diencephalon and basal ganglia. Symptoms usually include nystagmus, ataxia, dystonia, hypotonia and optic atrophy. Although the cause of the disease is genetically heterogeneous, mutations in the *surf-1* gene are the single most prevalent cause of LS [35]. The *surf-1* gene is highly conserved from prokaryotes to humans, and is expressed ubiquitously in human tissues, albeit at higher levels in aerobic tissues. It encodes a 31 kDa protein located in the inner mitochondrial membrane. Previous studies in human cells [36], mice [37] and yeast [38] showed that Surf-1 is involved in COX complex assembly. Nonetheless, the molecular mechanism leading to the pathogenic course of LS is not fully understood.

Zordan and co-workers performed a functional knock-down of Surf-1 in *Drosophila* using an RNAi strategy [39]. Post-transcriptional gene silencing was induced by GAL4-mediated expression of an UAS inverted-repeat transgene. Ubiquitous silencing results in severely impaired development. Larvae are smaller and exhibit profound alterations in spontaneous and light-induced locomotion. Most individuals die before

entering pupariation. Notably, behavioural and electrophysiological abnormalities were found not to be due to structural defects, but were rather caused by a deficient energy supply. When *surf-1* was silenced exclusively in the central nervous system (CNS), individuals developed to adulthood and exhibited altered mitochondria in larval muscles, and decreased COX activity in cephalic sections. Because both development and metamorphosis are high energy-requiring processes, a defect in respiration and ATP synthesis may be responsible for the developmental delay and the late larval lethality observed in Surf-1-deficient larvae. The results obtained in the *Drosophila* model suggest important functions for Surf-1 in COX activity, and establish a critical role for mitochondrial energy pathways in organogenesis, development and CNS function that are likely to be similar in humans.

Friedreich ataxia

Friedreich ataxia (FA) is an inherited recessive neurodegenerative disorder associated with a genetic insufficiency of frataxin in humans [40]. Frataxin is encoded by the *FRDA* gene and has a predicted size of 210 amino acids [41]. It is a mitochondrial iron chaperone that plays a critical role in iron storage, cellular iron homeostasis and biogenesis of Fe-S clusters. As an iron binding protein, frataxin prevents Fe^{+2} from generating toxic hydroxyl radicals inside the mitochondrial matrix.

Most FA patients are homozygous for a GAA triplet repeat expansion in the first intron of the *FRDA* gene. While normal chromosomes contain up to 40 repeats, FA chromosomes harbor between 90-1000 triplets. Due to the meiotic and mitotic instability of the expanded alleles, FA patients have insufficient frataxin levels, resulting in iron accumulation in mitochondria and dysfunctional iron-containing proteins, specifically aconitase and the OXPHOS complexes. The peripheral nervous system (PNS) and heart are

among the most severely affected tissues. Hence, FA is characterized by progressive neurological disability and heart abnormalities. The age of onset may vary from infancy to adulthood, but FA usually appears during childhood. Variations in symptoms and age of onset suggest that other factors in addition to the degree of triplet expansion influence disease progression, and there is currently no effective therapy for this devastating disease.

Frataxin is highly conserved throughout evolution. Orthologs have been identified in mammals, invertebrates, yeast and plants, and several models have already been used to gain insight into the functions of frataxin and its related disease. Previous studies in yeast revealed that deletion of YFH1, the frataxin homolog, produces iron accumulation in mitochondria and a progressive loss of respiratory competence and mtDNA. As a result, Δ YFH1 strains exhibit permanent mitochondrial damage and dysfunction [42]. Cell differentiation experiments performed in mouse cell lines demonstrated that frataxin is essential for development of neural lineages [43]. Although mouse models for FA showed early embryonic lethality [44] conditional inactivation of the mouse FA gene led to cardiomyopathy, sensory nerve defects and Fe-S enzyme deficiency [45].

A RNAi strategy was used in *Drosophila* to suppress production of the frataxin homolog (DFH) in a global or tissue-specific manner [46]. The main advantage in the *Drosophila* system as compared to other eukaryotic models is that inverted repeat transgenes used in RNAi reduce rather than totally eliminate the corresponding protein. Thus, the *Drosophila* model mimics more accurately the genetic origin of FA, which arises from a decrease rather than a complete loss of frataxin. Furthermore, the fly model also circumvents the early embryonic lethality reported in frataxin-null mice. Systemic suppression of the *dfr* gene led to large, long-lived larvae that showed diminished iron cofactor-dependent enzyme activity, and increased susceptibility to iron toxicity. Because prolonged larval development and failure to initiate and complete metamorphosis are

common features of *Drosophila* mutants defective in mtDNA maintenance, observations from this model prompted the hypothesis that DFH depletion may lead to increased mtDNA damage. Whereas silencing of the *dfh* gene in motor neurons had no deleterious effect, silencing in the PNS resulted in normal larval development but a reduced adult life span. Overexpression of primary ROS-metabolizing enzymes, such as SOD1, SOD2 and catalase in combination with silencing of the *dfh* gene did not improve the phenotype, suggesting that oxidative stress is not a major contributor.

The *Drosophila* model of FA is further validated by the fact that the vulnerability of the PNS to frataxin depletion is conserved across the animal kingdom. Because a DFH deficiency produces a robust phenotype in *Drosophila*, the fly model may aid in the identification of factors that alleviate FA symptoms, and the development of novel treatment strategies.

Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations

Point mutations in mtDNA are associated with a wide range of severe mitochondrial diseases, including a number of encephalomyopathies with complex clinical features [27]. Although some of the mutations have been characterized in cybrid cell lines, and demonstrated to produce a clear mitochondrial impairment, it has not been possible to study the consequences of the mutations in animal model systems because of the currently inability to transform mitochondria with exogenous DNA. Very recently, the first pathogenic mtDNA mutation in an intact animal was reported in *Drosophila*, a G-A transition that affects an evolutionarily conserved amino acid residue in the *ATP6* gene [47]. Point mutations in the human *ATP6* gene cause neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP), maternally inherited Leigh's syndrome (MILS) and familial bilateral striatal necrosis (FBSN) [27]. Notably, the G-A transition in the *ATP6* gene was found in

virtually homoplasmic levels in a *Drosophila sesB* stock that carries a mutation in the *ANT1* gene, which is associated with autosomal dominant progressive external ophtalmoplegia (adPEO) in humans [48]. Patients with PEO are predisposed to secondary mtDNA mutations, and it is thus possible that a similar mutator effect has occurred in *Drosophila*. The *ATP6* mutation inhibits significantly the activity of ATP synthase, but surprisingly does not affect the respiration rate, and therefore the mitochondria are uncoupled. Most interestingly, *Drosophila ATP6* mutants have a short life span, locomotion impairment and myodegeneration that are strictly progressive, a situation similar to human mitochondrial encephalomyopathy of mitochondrial origin. Although the mutation per se does not induce neurodegeneration, neurological dysfunction was apparent.

New perspectives for gene manipulation in *Drosophila*

Until recently, *Drosophila* models used in the study of mitochondrial dysfunction were based on the analysis of mutants generated by random mutagenic screens, or by gene silencing by RNAi that is based on P-element transgenesis. One of the main advantages of the fly system is the UAS-GAL4 binary system, which can be exploited to knockdown a target gene under the control of alternative promoters, thus restricting silencing to a desired spatio-temporal pattern. More recently, new technologies for gene manipulation in *Drosophila* have been expanded to include new genome integration methods based on bacteriophage ϕ C31 or *piggybacks* that show much less insertional specificity than P-elements [49]. Despite these advances, the study of specific mutations associated with human diseases has been hampered by the lack of gene targeting techniques, one of the main limitations in working with *Drosophila*. Golic and co-workers have recently circumvented this drawback with the development of efficient homologous recombination-based methods [50]. Any endogenous locus can be replaced or deleted by the expression of

a site-specific recombinase and a site-specific nuclease, taking advantage of the fact that double-strand breaks (DSB) in *Drosophila* DNA are recombinogenic. There are currently two techniques that use homologous recombination for gene replacement, “Ends-in” and “Ends-out”. These systems have similar efficiencies but present different advantages and disadvantages.

Ends-in

The Ends-in approach first introduces a version of the gene containing the mutation of interest in tandem with the endogenous allele, and then removes one of the copies leaving only the mutated or wild-type allele in the chromosome. The main advantage of this approach is that intact alleles can be recovered that harbor the desired mutation.

The Ends-in targeting technique is executed in three steps (Figure 1A and B). First, a P-element construct is generated that incorporates several specific features: a DNA region homologous to the target gene containing the specific mutation(s), two FLP Recombination Target (FRT) sequences, an I-Sce I endonuclease recognition site, an I-Cre I endonuclease recognition site, and a marker gene, usually *white*⁺. P-element transformation is performed by standard methods [4]. The range of total local homology that has led to successful targeting is between 2 kb and 9 kb, with >4 kb utilized in most cases [51]. Second, a series of crosses between the transgenic flies carrying the donor element with fly stocks harbouring FLP and I-Sce I transgenes allow the expression of the enzymes by heat shock induction, thus generating the recombinogenic donor, and inducing targeted homologous recombination. Homologous recombination generates a typical structure in which the endogenous and the mutant copies of the gene flank the marker gene at the target locus. The *wild-type—white*⁺*—mutant* gene structure is not expected to manifest a phenotype until reduction. Finally, a second homologous recombination event

resulting from expression of the endonuclease I-Cre I removes one copy of the gene, the wild-type or the mutant, and the *white* marker. This results in the replacement of the endogenous copy with a version containing the specific mutation without any other alterations in the genome. To date, this novel method has been used to generate mutant alleles of several endogenous *Drosophila* genes [52].

Ends-out

Ends-out targeting is the most frequently used method in mice and yeast. This technique starts with a different donor construct structure, and also differs from Ends-in in the position of the specific-site endonuclease cleavage sites (Figure 1C). The double-stranded breakage occurs at the outer ends of donor DNA. The process of Ends-out targeting is similar to Ends-in targeting; through the action of FLP and I-Sce I, a linear DNA extrachromosomal donor fragment is generated, and it is targeted to the endogenous allele by homologous recombination. Two of the advantages of the Ends-out method are that the target gene can be replaced without the involvement of a tandem duplication, thus generating a knock-in or knock-out in one step. In addition, the donor construct is easier to make than in Ends-in. The disadvantage of this technique is that the end product leaves exogenous sequence at the altered locus, usually the marker gene [53]. Ends-out gene targeting has been used successfully to target *yellow*, the myocardin-related transcription factor *DMRTF*, and the odorant-receptor gene, *Or83b* (reviewed in [49]).

Current models of mitochondrial diseases in flies

In our laboratories, we are developing a *Drosophila* model of mitochondrial pathology associated with pol γ mutations using the knock-in technology. Even though we have been successful in circumventing by low-level expression the deleterious phenotypes engendered with high-level overexpression of wild-type pol γ - α , we recognize that

potential problems may result from developmental and spatial mis-expression of a transgene. Thus, we have altered our strategy for mutagenesis in *Drosophila* to use targeted gene replacement by homologous recombination (Figure 2). Our objective has been to introduce in *Drosophila* versions of the *pol* $\gamma\alpha$ gene that are associated with PEO in humans, and to examine the effects of several mutations in the *Drosophila* *pol* $\gamma\alpha$ and *pol* $\gamma\beta$ genes for which disease phenotypes have not yet been reported in humans. Of the 30 different mutations that have been identified in the human *polG-A* gene [54], approximately half are in strictly conserved positions in the orthologous gene in *Drosophila*. We have selected two, A467T and Y955C (A434T and Y873C in *Drosophila*), which map within the conserved γ I element in the spacer region and the *pol* domain, respectively, and for which we and others have already evaluated the biochemical defects upon recombinant expression in the baculovirus system [55-58]. We have also selected the *Drosophila* γ 3 spacer-region mutation F578A, for which we have defined the biochemical defects [59]. In addition, we have introduced a double mutation (D185A and D263A) within two active site aspartate residues in the exonuclease domain, which we have shown to cause developmental defects, delays and arrest, and to limit life span when it is expressed at a low level using the UAS-GAL4 system in transgenic animals. Finally, we took advantage of our prior discovery that the two subunits of *Drosophila* *pol* γ map within a compact gene cluster [60] to generate a fragment containing ~12 kb donor homology that carries both the *pol* $\gamma\alpha$ and $\gamma\beta$ genes, with the *I-SceI* site introduced between them. This allowed us to introduce specific amino acid substitutions in both *pol* $\gamma\alpha$ and $\gamma\beta$ in a single recombinant donor construct. After homologous recombination, the expected product is a tandem partial duplication of the target genome sequence, with one copy containing the desired *pol* $\gamma\alpha$ mutation and the other copy containing the desired *pol* $\gamma\beta$ mutation. As a result, we have also introduced three mutations in the C-terminal region

of the *Drosophila* accessory subunit gene, which we have shown to be deleterious in our biochemical analysis of human pol γ - β .

Our immediate goals will be to evaluate these models using established protocols in *Drosophila* to analyze mtDNA content and integrity, respiratory chain complex activity, mitochondrial distribution and function, apoptotic signaling and importantly, larval and adult behavior. We expect to establish an experimental system of mtDNA replication failure that is analogous to that associated with human pathologies and in doing so, we will establish a direct correlation between the defect(s) that the mutants exhibit in our biochemical assays and their phenotypic effects *in vivo*. We anticipate that this will set the stage for us to use the power of *Drosophila* molecular genetics to search for factors that modulate the phenotype, either augmenting or ameliorating it.

Concluding remarks

Although tissues requiring high oxidative metabolism are affected most severely in mitochondrial disorders, specific tissue involvement varies considerably. In order to develop therapies for these diseases, it is necessary to determine both the cellular processes and the tissues that are altered by insufficient energy supply. *Drosophila* models can help us to understand common aspects of these pathologies because they enable the identification of critical times, cell types and tissues that account for the disease-like phenotypes. Global transcriptional analysis of these models has already revealed many sets of genes, including those related to stress responses and metabolism, which are systematically up- or down-regulated according to the degree of the mitochondrial dysfunction. The ultimate aim of such transcriptomic approaches is to identify potential pharmacological targets in mitochondrial disease. Because the recent development of efficient gene targeting methods has paved the way for the introduction of specific

mutations responsible for human mitochondrial diseases, *Drosophila* offers substantial promise for understanding the pathogenic mechanisms of this devastating group of diseases.

Acknowledgements

We thank Erin Wakeling for critical reading and comments on the manuscript. This work was supported by European Union Project QLGI-CT-2001-00966, Ministerio de Ciencia y Tecnologia, Spain (Grants BMC01-1525 and BFU2004-04591) and Instituto de Salud Carlos III, Redes de centros RCMN (C03/08) and Temáticas (G03/011 (to R.G.) and National Institutes of Health Grant GM45295 (to L.S.K.).

References

- [1] G.M. Rubin, E.B. Lewis, A brief history of *Drosophila's* contributions to genome research, *Science* 287 (2000) 2216-2218
- [2] M.A. Fernández-Moreno, C.L. Farr, L.S. Kaguni, R. Garesse, *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Function, in *Methods in Molecular Biology*. (in press).
- [3] M. Bate, A. Martínez-Arias, The development of *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
- [4] G.M. Rubin, A.C. Spradling, Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors,. *Science* 218 (1982) 348-353.
- [5] A.H. Brand, N. Perrimon, Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development* 118 (1993) 401-415.
- [6] K.J. Venken, H.J. Bellen,. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 167-78. Erratum in: *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005)340.
- [7] J. Bilen, N.M. Bonini, *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease, *Annu Rev Genet.* 39 (2005) 153-171.
- [8] R. Garesse, C.G. Vallejo, Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes, *Gene* 263 (2001)1-16
- [9] R.C. Scarpulla, Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis, *Biochem. Biophys. Acta* 1576 (2002) 1-14.
- [10] R.C. Scarpulla, Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 673-683

- [11] S.M. DeSimone, K. White, The *Drosophila* erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein. *Mol Cell Biol.* 13 (1993) 3641-3649.
- [12] R. Garesse, L.S. Kaguni, A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation, *IUBMB Life.* 57 (2005) 555-561.
- [13] M. Sardiello, G. Tripoli, A. Romito, C. Minervini, L. Viggiano, C. Caggese, G. Pesole, Energy biogenesis: one key for coordinating two genomes, *Trends in Genet.* 21 (2005) 12-16.
- [14] M.Galloni, Bonsai, a ribosomal protein S15 homolog, involved in gut mitochondrial activity and systemic growth, *Dev Biol* 264 (2003) 482-494.
- [15] S.L. Helfand, B. Rogina, Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster* *Annu. Rev. Genet.* 37 (2003) 329-348.
- [16] Y.H. Song, *Drosophila melanogaster*: a model for the study of DNA damage checkpoint response, *Mol.Cell* 19 (2005) 167-179.
- [17] J.E. Wilhelm, C.A. Smibert, Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*, *Biol. Cell.* 97 (2005) 235-252.
- [18] S.A. Davies, Signalling via cGMP: Lessons from *Drosophila*. *Cell Signal.* 18 (2006) 409-421.
- [19] R. Farahani, C.G. Haddad, Understanding the molecular responses to hypoxia using *Drosophila* as a genetic model, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 135 (2003) 221-229.
- [20] R.L. Davis, Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005) 275-302.
- [21] P.E. Hardin, The circadian timekeeping system of *Drosophila*, *Curr Biol.* 15 (2005) 714-722.

- [22] L. Chen, M.B. Feany, Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 657-663.
- [23] E.C. Woodhouse, L.A. Liotta, *Drosophila* invasive tumors: a model for understanding metastasis, *Cell Cycle* 3 (2004) 38-40.
- [24] M.J. Wolf, H. Amrein, J.A. Izatt, M.A. Choma, M.C. Reedy, H.A. Rockman, *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 1394-1399.
- [25] M. Saitoe, J. Horiuchi, T. Tamura, N. Ito, *Drosophila* as a novel animal model for studying the genetics of age-related memory impairment, (16) *Rev. Neurosci.* (2005) 137-149.
- [26] M. Wilson, J.H. Widdicombe, K. Gohil, K.C. Burtis, A.Z. Reznick, C.E. Cross, J.P. Elserich, Are *Drosophila* a useful model for understanding the toxicity of inhaled oxidative pollutants: a review. *Inhal. Toxicol.* 17 (2005) 765-774.
- [27] R. McFarland, R.W. Taylor and D.M. Turnbull, The neurology of mitochondrial DNA disease, *The Lancet Neurology* 1 (2002) 343-351.
- [28] J.A. Smeitink, M. Zeviani, D.M. Turnbull, H.T. Jacobs, Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders, *Cell Metab.* 3 (2006) 9-13.
- [29] A. Spinazzola, M. Zeviani, Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signalling, *Gene* 354 (2005) 16-18.
- [30] R.K. Naviaux, W.L. Nyhan, B.A. Barshop, J. Poulton, D. Markusic, N.C. Karpinski, R.H. Haas, Mitochondrial DNA polymerase γ deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann. Neurol.* 45 (1999) 54-58.

- [31] E. Lefai, M. Calleja, I. Ruiz de Mena, A.T. Lagina III, L.S. Kaguni, R. Garesse, Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase γ results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Gen. Genet.* 264 (2000) 37-46.
- [32] J.M. Toivonen, K.M. O'Dell, N. Petit, S.C. Irvine, G.K. Knight, M. Lehtonen, M. Longmuir, K. Luoto, S. Touraille, Z. Wang, S. Alziari, Z.H. Shah, H.T. Jacobs, Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness, *Genetics* 159 (2001) 241-254.
- [33] H.T. Jacobs, D. J. Fernandez-Ayala, S. Manjiry, E. Kemppainen, J.M. Toivonen, K.M. O'Dell, (2004). Mitochondrial disease in flies." *Biochim. Biophys. Acta*, 1659 (2004) 190-196.
- [34] S. DiMauro, E.A. Schon, Mitochondrial respiratory chain diseases, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2656-2658.
- [35] M. Bohm, E. Pronicka, E. Karcmarewicz, M. Pronicki, D. Piekutowska-Abramczuk, J. Sykut-Cegielska, H. Mierzevska, H. Hansikova, K. Vesela, M. Tesarova, H. Houstkova, J. Houstek, J. Zeman, Restrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome c oxidase deficiency, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 21-26.
- [36] V. Tiranti, C. Galimberti, L. Nijtmans, S. Bovolenta, M.P. Perini, M. Zeviani,. Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions, *Hum Mol Genet* 8 (1999) 2533-2540.
- [37] A. Agostino, F. Invernizzi, C. Tiveron, G. Fagiolari, A. Prella, E. Lamantea, A. Giavazzi, G. Battaglia, L. Tatangelo, V. Tiranti, M. Zeviani, Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 399-413.
- [38] L.G. Nijtmans, M. Artal-Sanz, M. Bucko, M.H. Farhoud, M. Feenstra, G.A. Hakkaart, M. Zeviani, L.A. Grivell, Shy1p occurs in a high molecular weight complex

and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast, *FEBS Lett* 498 (2001) 46-51.

[39] M.A.Zordan, P. Cisotto, C. Benna, A. Agostino, G. Rizzo, A. Piccin, M. Pegoraro, F. Sandrelli, G. Perini, G. Tognon, R. De Caro, S. Peron, T.T. Kronnie, A. Megighian, C. Reggiani, M. Zeviani, R. Costa, Post Transcriptional Silencing and Functional Characterization of the *Drosophila melanogaster* Homolog of HumanSurf1, *Genetics* 172 (2006) 229-241.

[40] V. Campuzano, L. Montermini, M.D. Molto, L. Pianese, M. Cossee, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Canizares, H. Koutnikova, S.I. Bidichandani, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. De Frutos, F. Palau, P.I. Patel, S. Di Donato, J.L. Mandel, S. Coccozza, M. Koenig, M. Pandolfo, Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion, *Science* 271(1996) 1423-1427.

[41] M. Pandolfo, Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction, *Mitochondrion* 2 (2002) 87-93.

[42] M. Babcock, D. de Silva, R. Oaks, S. Davis-Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo, J. Kaplan, Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of frataxin, *Science* 276 (1997) 1709-1712.

[43] M. McBurney, W., E. M. Jones-Villeneuve, M.K. Edwards, P.J. Anderson, Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line, *Nature* 299 (1982) 165-167.

- [44] M. Cossee, H. Puccio, A. Gansmuller, H. Koutnikova, A. Dierich, M. LeMeur, K. Fischbeck, P. Dolle, M. Koenig, Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation, *Hum Mol Genet* 9 (2000) 1219-1226.
- [45] H. Puccio, D. Simon, M. Cossee, P. Criqui-Filipe, F. Tiziano, J. Melki, C. Hindelang, R. Matyas, P. Rustin, M. Koenig, Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits, *Nat Genet* 27 (2001) 181-186.
- [46] P.R. Anderson, K. Kirby, A.J. Hilliker, J.P. Phillips, RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*, *Hum Mol Genet* 14 (2005) 3397-3405.
- [47] A.M. Celotto, A.C. Frank, S.W. McGrath, T. Fergestad, W.A. Van Voorhies, K.F. Buttle, C.A. Mannella, M.J. Palladino, Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*, *J. Neurosci.* 26 (2006) 810-820.
- [48] J. Kaukonen, J.K. Juselius, V. Tiranti, A. Kittala, M. Zeviani, G.P. Comi, S. Keranene, L. Peltonene, A. Suomalainen, Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance, *Science* 289 (2000) 782-785.
- [49] K.J. Venken, H.J. Bellen, Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 167-178.
- [50] Y.S. Rong, K.G. Golic, Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*, *Science* 288 (2000) 2013-2018.

- [51] X. Bi and Y.S. Rong, Genome manipulation by homologous recombination in *Drosophila*, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2 (2003) 142-146.
- [52] Y.S. Rong, S.W. Titen, H.B. Xie, M.M. Golic, M. Bastiani, P. Bandyopadhyay, B.M. Olivera, M. Brodsky, G.M. Rubin, K.G. Golic, Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*, *Genes Development* 16 (2002) 1568-1581.
- [53] W.J. Gong, K.G. Golic, Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 2556-2561.
- [54] A. Di Fonzo, A. Bordoni, M. Crimi, G. Sara, R. Del Bo, N. Bresolin, G.P. Comi, POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions *Hum Mutat* 22 (2003) 498-499.
- [55] P.T. Luoma, N. Luo, W.N. Loscher, C.L. Farr, R. Horvath, J. Wanschitz, S. Kiechl, L.S. Kaguni, A. Suomalainen, Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1907-1920.
- [56] S.S. Chan, M.J. Longley, W.C. Copeland, The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit, *J Biol Chem* 280 (2005) 31341-31346.
- [57] M.V. Ponamarev, M.J. Longley, D. Nguyen, T.A. Kunkel, W.C. Copeland, Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis, *J Biol Chem* 277 (2002) 15225-15228.
- [58] M.A. Graziewicz, M.J. Longley, R.J. Bienstock, M. Zeviani, W.C. Copeland, Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal

dominant progressive external ophthalmoplegia, *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004) 770-776.

[59] N. Luo, L.S. Kaguni, Mutations in the spacer region of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function, *J Biol Chem* 280 (2005) 2491-2497.

[60] E. Lefai, M.A. Fernandez-Moreno, L.S. Kaguni, R. Garesse, The highly compact structure of the mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications, *Insect Mol Biol* 9 (2000) 315-322.

Figure Legends

Figure 1. Gene targeting in *Drosophila*. A, Ends-In technique and the elements of the donor construct. After transgenesis the combined action of FLP and endonuclease I-Sce I generates the recombinogenic template, which produces the duplication at the target gene locus by homologous recombination. B, reduction of target gene repeats. The double-strand break caused by endonuclease I-Cre I induces the second recombination. Ends-in targeting introduces a point mutation (green dot) in one of the alleles of the target gene. C, Ends-Out technique. FLP and I-Sce I generate a linear DNA molecule that undergoes homologous recombination with the target gene.

Figure 2. Pol γ knock-in in *Drosophila*.

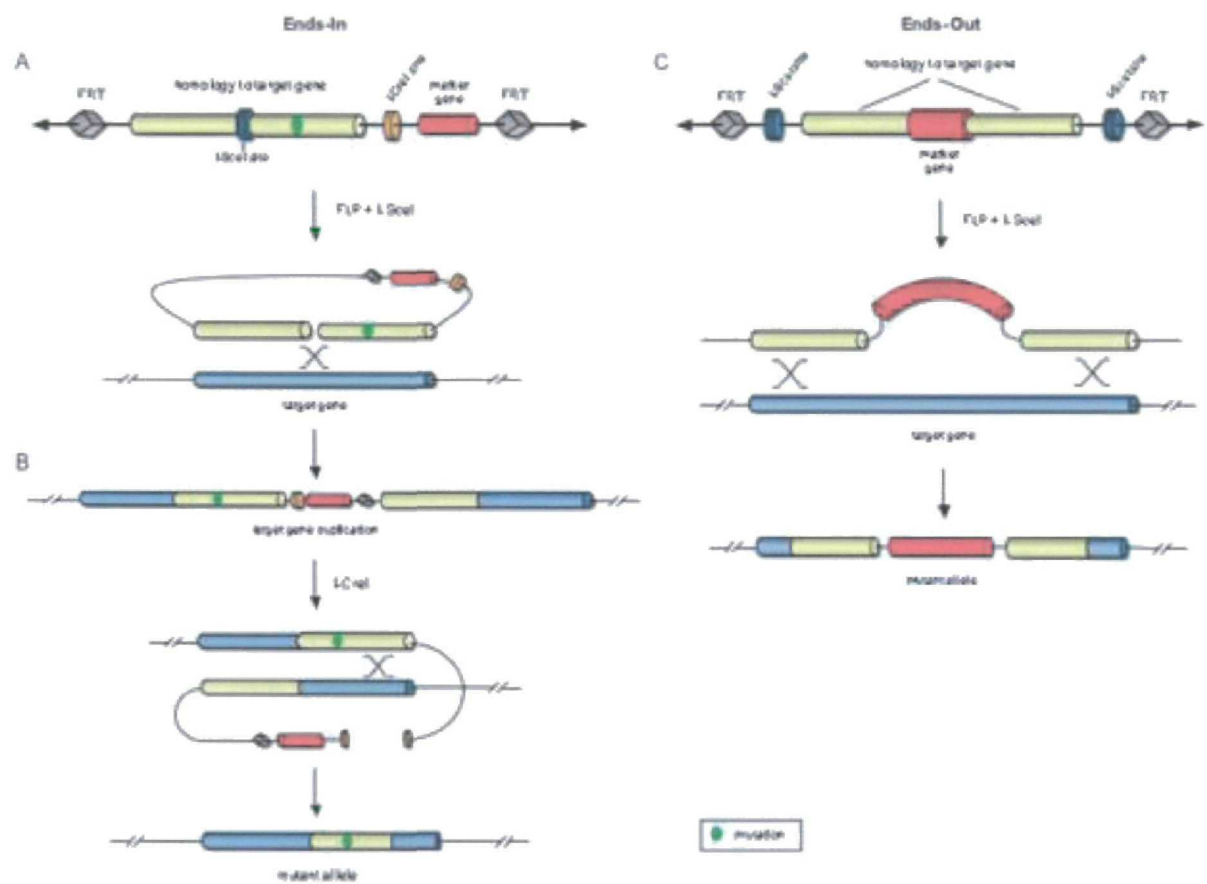
Approximately 12 kb of DNA from the *D. melanogaster* pol γ cluster genomic region [60] was amplified by PCR and cloned into the vector pBluescript. For simplicity, only the *pol* γ - α and *pol* γ - β genes are shown schematically (arrows). The I-Sce I recognition site was introduced between the genes, and this construct was used to generate specific mutations (boxed in yellow) in the pol γ - α or pol γ - β coding regions. The conserved exonuclease (I, II and III), and polymerase (A, B and C) active site motifs are indicated by boxes. Each of the modified genomic DNAs was cloned into the Not I site of the pTV2 vector, and the orientation of the inserted DNA was confirmed by Kpn I digestion. The main features of the pTV2 vector are indicated as follows: FRTs (arrows), *white*⁺ marker gene (red box), I-Cre I recognition site (blue box), Not I recognition sites (thin arrows).

Abbreviations

mtDNA, mitochondrial DNA; OXPHOS, oxidative phosphorylation; NRG, Nuclear Respiratory Gene; COX, cytochrome oxidase; MDS, mtDNA depletion syndrome; pol γ - α , DNA polymerase γ catalytic subunit; LS, Leigh Syndrome; CNS, central nervous system; FA, Friedreich's ataxia; adPEO, autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia; RNAi, RNA interference; PNS, peripheral nervous system; DSB, double-strand break

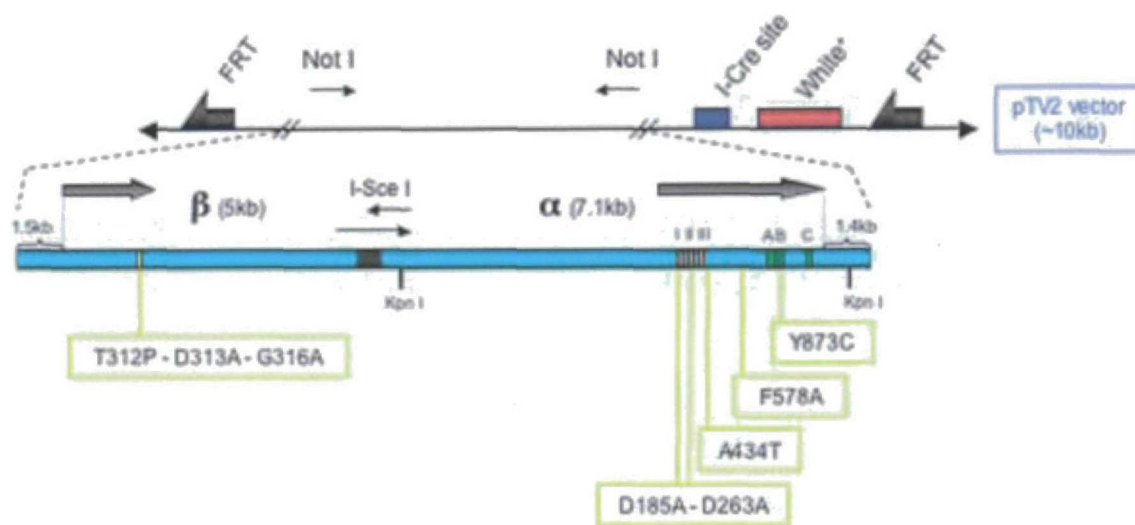
Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Table

Gene	DNA Sequence Elements		
	DRE	NRG	EWG
pol γ - α	-	-	+
pol γ - β	+	+	-
mtSSB	+	+	-
mtDNA helicase	+	-	-
mtRNA pol	-	+	-
TFAM	+	+	-
mtTFB1	+	-	-
mtTFB2	+	-	-
mtTTF	+	-	-

The proximal promoter (2 Kb) and 3'-upstream gene regions of several genes encoding essential factors for *Drosophila* mtDNA metabolism have been analyzed *in silico*, to search for potential binding sites for DREF, NRG and EWG. The functional role of all DREF binding sites except that in the gene for mtTFB1 has been demonstrated by EMSA and cell transfection analyses.

